

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Développement d'une biochips à ADN permettant l'identification des germes pathogènes impliqués dans les pneumonies nosocomiales

Nazé, Florence

Award date:
2004

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

**DEVELOPPEMENT D'UNE BIOCHIPS À ADN PERMETTANT L'IDENTIFICATION DES
GERMES PATHOGENES IMPLIQUES DANS LES PNEUMONIES NOSOCOMIALES**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en sciences biologiques**

Florence NAZÉ

Juin 2004

Développement d'une biochips identifiant les principaux germes pathogènes impliqués dans les pneumonies nosocomiales

NAZE Florence

Résumé

Transmise lors d'un séjour dans un établissement de soin, les pneumonies nosocomiales sont des pathologies très graves présentant des sources de contamination multiples. Caractérisées par un taux de mortalité élevé ainsi que par d'importants coûts hospitaliers, elles représentent un gros problème de santé publique. Il est donc indispensable de pouvoir les diagnostiquer rapidement et spécifiquement.

Un microdamier à ADN fut donc conçu afin de détecter les 20 principales espèces bactériennes impliquées dans ce type de pneumonies. L'amplification d'une séquence phylogénétiquement conservée chez ces 20 espèces va tout d'abord être réalisée à l'aide d'amorces consensus. Les produits amplifiés seront ensuite hybridés au niveau d'un support comportant des sondes situées dans les régions les moins conservées de la séquence amplifiée. L'incorporation de nucléotides biotinylés au niveau de la PCR permettra la détection des amplicons par colorimétrie.

Actuellement, la PCR a permis l'amplification de 19 espèces sur 20. Les différentes sondes de capture ont ensuite été sélectionnées et les conditions d'hybridation mises au point afin d'optimiser sa spécificité. A ce stade, la biochips permet l'identification de 13 espèces sur 20.

Un test de sensibilité fut réalisé chez deux espèces et présente une limite permettant de détecter un nombre de copies d'ADN génomique correspondant successivement à 10^2 et 10^3 .

Table des matières

I. Introduction

| | |
|--|-----------|
| <u>1. Les infections nosocomiales</u> | 2 |
| 1.1. <u>Définition</u> | 2 |
| 1.2. <u>Classification et facteurs de risque</u> | 2 |
| 1.3. <u>Type d'infection</u> | 3 |
| <u>2. Les pneumonies nosocomiales</u> | 3 |
| 2.1. <u>Origine</u> | 3 |
| 2.2. <u>Physiopathologie</u> | 4 |
| 2.2.1. <u>Généralités</u> | 4 |
| 2.2.2. <u>Symptomatologie</u> | 5 |
| 2.2.3. <u>Complications</u> | 5 |
| 2.3. <u>Epidémiologie</u> | 5 |
| 2.4. <u>Facteurs de risques et prévention</u> | 6 |
| 2.4.1. <u>Les facteurs inhérents à l'hôte</u> | 6 |
| 2.4.2. <u>Les facteurs favorisant la colonisation du pharynx ou de l'estomac par des microorganismes</u> | 6 |
| 2.4.3. <u>Les facteurs favorisant l'aspiration ou le reflux gastriques et oro-pharyngés</u> | 7 |
| 2.4.4. <u>Les conditions requérant l'utilisation d'un respirateur artificiel ou d'un équipement respiratoire contaminé</u> | 7 |
| 2.4.5. <u>Les cas de contaminations par les mains</u> | 7 |
| 2.4.6. <u>Les facteurs empêchant un déroulement normal de la fonction respiratoire</u> | 7 |
| 2.5. <u>Les agents pathogènes</u> | 8 |
| 2.5.1. <u>Les GRAM positives</u> | 8 |
| 2.5.1.1. <u>Staphylococcus aureus</u> | 8 |
| 2.5.1.2. <u>Streptococcus pneumoniae</u> | 8 |
| 2.5.1.3. <u>Les autres Gram +</u> | 9 |
| 2.5.2. <u>Les GRAM négatives</u> | 9 |
| 2.5.2.1. <u>Escherichia coli et la flore de substitution</u> | 9 |
| 2.5.2.2. <u>Pseudomonas aeruginosa</u> | 10 |
| 2.5.2.3. <u>Haemophilus influenzae</u> | 10 |
| 2.5.2.4. <u>Les autres GRAM -</u> | 10 |
| 2.5.3. <u>Legionella spp et la légionellose</u> | 11 |
| 2.6. <u>Traitement</u> | 11 |
| 2.7. <u>Méthode diagnostic</u> | 11 |
| 2.7.1. <u>Examen microscopique direct des expectorations</u> | 12 |
| 2.7.2. <u>La culture d'agents pathogènes</u> | 12 |
| 2.7.2.1. <u>L'aspiration endotrachéale</u> | 12 |
| 2.7.2.2. <u>Le lavage bronchoalvéolaire</u> | 13 |
| 2.7.2.3. <u>Le brossage bronchique protégée</u> | 13 |
| 2.7.3. <u>La détection d'antigènes</u> | 13 |
| 2.7.4. <u>Les tests sérologiques</u> | 13 |
| 2.7.5. <u>Techniques de diagnostic moléculaire</u> | 14 |
| <u>3. Les biochips</u> | 14 |
| 3.1. <u>Principe</u> | 14 |

| | |
|--|----|
| <u>3.2. Elaboration d'une biochips</u> | 14 |
| <u>3.2.1. Choix du support</u> | 14 |
| <u>3.2.2. Fixation des ADN trappeurs</u> | 15 |
| <u>3.2.2.1. Les méthodes de couplage non-covalentes</u> | 15 |
| <u>3.2.2.2. Les méthodes de couplage covalentes</u> | 15 |
| <u>3.2.3. Mode d'adressage des ADN trappeurs</u> | 16 |
| <u>3.2.3.1. La synthèse in situ</u> | 16 |
| <u>3.2.3.2. La microdéposition</u> | 16 |
| <u>3.3. Hybridation de l'ADN cible</u> | 16 |
| <u>3.3.1. Principe</u> | 16 |
| <u>3.3.2. Paramètres influençant l'hybridation</u> | 17 |
| <u>3.3.2.1. La température d'hybridation</u> | 17 |
| <u>3.3.2.2. La concentration en sels</u> | 17 |
| <u>3.3.2.3. Le % en GC</u> | 17 |
| <u>3.3.2.4. La taille de l'ADN cible</u> | 18 |
| <u>3.4. Technique de détection</u> | 18 |
| <u>3.4.1. La radioactivité</u> | 18 |
| <u>3.4.2. La fluorescence</u> | 18 |
| <u>3.4.3. La colorimétrie</u> | 18 |
| <u>3.5. Classification suivant l'application</u> | 19 |
| <u>3.5.1. La biochips "à expression de gènes"</u> | 19 |
| <u>3.5.2. La biochips "à ADN" ou biochips diagnostic</u> | 19 |
| <u>3.5.2.1. La détection de polymorphisme génétique</u> | 19 |
| <u>3.5.2.2. La mise en évidence d'agents infectieux</u> | 20 |

II. Objectif

| | |
|----------------------------|----|
| <u>Objectif du mémoire</u> | 22 |
|----------------------------|----|

III. Matériel et méthode

| | |
|--|----|
| <u>1. LA PCR</u> | 24 |
| <u>1.1. Principe</u> | 24 |
| <u>1.2. Matériel</u> | 24 |
| <u>1.3. Méthode</u> | 25 |
| <u>1.3.1. Préparation de l'échantillon</u> | 25 |
| <u>1.3.1.1. En PCR1</u> | 25 |
| <u>1.3.1.2. En PCR2</u> | 25 |
| <u>1.3.2. Lancement du programme PCR</u> | 25 |
| <u>2. Electrophorèse sur gel d'agarose</u> | 26 |
| <u>2.1. Principe</u> | 26 |
| <u>2.2. Matériel</u> | 26 |
| <u>2.3. Méthode</u> | 27 |
| <u>2.3.1. Préparation du gel d'agarose 1%</u> | 27 |
| <u>2.3.2. Migration des échantillons</u> | 27 |
| <u>3. Purification d'un produit PCR ayant migré sur gel d'agarose 1%</u> | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 3.1. Principe | 27 |
| 3.2. Matériel | 27 |
| 3.3. Méthode | 28 |
| 4. Séquençage | 28 |
| 4.1. Principe | 28 |
| 4.2. Matériel | 28 |
| 4.3. Méthode | 29 |
| 5. Fixation des ADN trappeurs | 29 |
| 5.1. Principe | 29 |
| 5.2. Matériel | 30 |
| 5.3. Méthode | 30 |
| 5.3.1. Préparation de la plaque | 30 |
| 5.3.2. Fixation proprement dite | 30 |
| 5.3.3. Lavage des lames | 30 |
| 6. Hybridation de l'ADN sur biochips et mise en évidence par une coloration à l'argent | 31 |
| 6.1. Principe | 31 |
| 6.2. Matériel | 31 |
| 6.3. Méthode | 32 |
| 6.3.1. Hybridation du produit PCR | 32 |
| 6.3.2. Lavages des lames | 32 |
| 6.3.3. Coloration à l'argent | 32 |
| 6.3.4. Numérisation et quantification des damiers | 33 |

IV. Résultats et discussion

| | |
|---|-----------|
| 1. Amplification par PCR et séquençage du gène de la gyrase | 35 |
| 1.1. Détermination du gène marqueur | 35 |
| 1.2. Sélection des amorces | 35 |
| 1.3. Mise au point de la PCR | 36 |
| 1.4. Amplification du marqueur gyrase | 37 |
| 1.4.1. Amplification de l'ADN cible au niveau des 5 espèces de GRAM + à l'aide du couple d'amorces gyr 1 /gyr 3 | 37 |
| 1.4.1.1. Conditions expérimentales | 37 |
| 1.4.1.2. Résultats et conclusions | 37 |
| 1.4.2. Amplification du gène de la gyrase chez les 15 espèces de GRAM - à l'aide du couple d'amorces gyr 1 /gyr 5 | 37 |
| 1.4.2.1. Conditions expérimentales | 37 |
| 1.4.2.2. Résultats et conclusions | 37 |
| 1.4.3. Amplification de l'ADN cible au niveau des 8 de GRAM - restantes à l'aide du couple d'amorces gyr 1 /gyr 4 | 38 |
| 1.4.3.1. Conditions expérimentales | 38 |
| 1.4.3.2. Résultats et conclusions | 38 |
| 1.4.4. Amplification de l'ADN cible au niveau des 5 dernières espèces à l'aide du couple d'amorces gyr1 /gyr 2 | 39 |
| 1.4.4.1. Conditions expérimentales | 39 |
| 1.4.4.2. Résultats et conclusions | 39 |
| 1.4.5. Conclusion générale | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 1.5. Séquençage des différents fragments | 40 |
| 1.5.1. Conditions expérimentales | 40 |
| 1.5.2. Résultats et conclusions | 40 |
| 2. Recherche de séquences trappeurs | 41 |
| 3. Hybridation des ADN cibles | 42 |
| 3.1. Hybridations des 19 ADN cibles produits par PCR au niveau de la biochips et mise au point des conditions | 43 |
| 3.1.1. Test de spécificité des ADN trappeurs | 43 |
| 3.1.1.1. Conditions expérimentales | 43 |
| 3.1.1.2. Résultats et conclusions | 43 |
| 3.1.2. Etude de la stringence des lavages post-hybridation | 44 |
| 3.1.2.1. Conditions expérimentales | 44 |
| 3.1.2.2. Résultats et conclusions | 45 |
| 3.1.3. Augmentation de la température d'hybridation | 46 |
| 3.1.3.1. Conditions expérimentales | 46 |
| 3.1.3.2. Résultats et conclusions | 46 |
| 3.2. Sensibilité de la biochips pour <i>H.influenzae</i> et de <i>S.oralis</i> | 46 |
| 3.2.1. Conditions expérimentales | 46 |
| Les conditions d'hybridation restent identiques à celles décrites au niveau du point III.6.3. 47 | |
| 3.2.2. Résultats et conclusions | 47 |

V. Conclusions et perspectives

| | |
|---|-----------|
| <u>CONCLUSION ET PERSPECTIVE</u> | 49 |
|---|-----------|

VI. Bibliographie

Liste des abréviations

A : adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADN_c : acide désoxyribonucléique complémentaire
ARN : acide ribonucléique
ARN_m : acide ribonucléique messenger
C : cytosine
°C : degré celcius
dNTP : déoxynucléotide triphosphate
dATP : déoxynucléotide adénine triphosphate
dCTP : déoxynucléotide cytosine triphosphate
dGTP : déoxynucléotide guanine triphosphate
dUTP : déoxynucléotide uracile triphosphate
EAT: Eppendorf Array Technology
G : guanine
GB : globules blancs
K₂HPO₄ : monophosphate de potassium
KH₂PO₄ : biphosphate de potassium
M : molaire
mg : milligramme
ml : millilitre
mM : millimolaire
mm³ : millimètre cube
NaBH₄ : borohydrure de sodium
NaOH: hydroxyde de sodium
ng : nanogrammes
nM : nanomolaire
PBS : phosphate buffer saline
PCR : polymerase chain reaction
T : thymine
Taq : *thermus aquaticus*
T_m : température de melting
U : unité
U : uracile
µg : microgrammes
µl : microlitre
µM : micromolaire
U.V : Ultra Violet
WB : Washing buffer

I. Introduction

1. Les infections nosocomiales

1.1. Définition

Une infection nosocomiale ou hospitalière est une pathologie contractée par un patient dans un établissement de soin (nosocomial venant du grec "nosokomeone", qui signifie "hôpital"). Par définition, elle est absente lors de l'admission du patient et est acquise lors de son hospitalisation.

L'infection est classiquement considérée comme nosocomiale si elle apparaît après un délai de 48h d'hospitalisation. Ce dernier peut s'élever à 30 jours dans le cas de plaies opératoires, et même à un an s'il y a mise en place d'une prothèse ou d'un implant (Ducel et al., 2002).

1.2. Classification et facteurs de risque

On classe communément ces infections en deux types distincts (Ducel et al., 2002):

- **Les infections d'origine endogène:** représentant 50% des infections nosocomiales, elles sont dues à une contamination du patient par ses propres germes. L'agent causal est donc déjà présent chez le patient lors de son admission à l'hôpital mais le développement de l'infection résulte d'une altération de la santé du malade liée à son séjour.
- **Les infections d'origine exogène:** il s'agit soit d'infections transmises entre malades ou avec le personnel soignant, soit d'infections liées à la contamination de l'environnement hospitalier.

Néanmoins, quel que soit le mode de transmissions, la survenue de ce type d'infection semble dépendante de trois facteurs principaux:

- **L'âge et la pathologie du patient:** les personnes âgées, les immunodéprimés, les nouveaux-nés, les polytraumatisés et les grands brûlés sont particulièrement sensibles à ce type d'infection.
- **Le traitement du patient:** certains antibiotiques peuvent en effet déséquilibrer la flore du patient et surtout sélectionner des bactéries résistantes. Les traitements immunosuppresseurs présentent également un risque important pour le malade.
- **Les actes invasifs impliqués dans le traitement du patient:** le sondage urinaire, la pose d'un cathéter, la ventilation artificielle et surtout les interventions chirurgicales sont autant de facteurs pouvant favoriser l'apparition de ce type d'infection.

1.3. Type d'infection

Les infections nosocomiales se développent au niveau de nombreux sites (fig. I.1). Outre les **pneumonies** dont nous discuterons longuement par la suite, on retrouve (Ducel et al., 2002) :

- **Les infections urinaires:** complication habituelle d'un sondage urinaire, elles représentent 40 % des infections nosocomiales dont elles sont l'une des moins dangereuses.
- **Les infections de plaies opératoires:** superficielles ou profondes, elles se caractérisent par la présence de pus au niveau de l'incision chirurgicale.
- **La bactériémie nosocomiale:** elle se caractérise par la présence d'un agent pathogène au niveau du sang, et cela en l'absence de toute autre infection. Bien que représentant seulement 5% des infections nosocomiales, son taux de mortalité de plus de 50% la rend particulièrement dangereuse.
- **Les autres sites d'infections:**
 - La peau et les tissus mous
 - Le tractus gastro-intestinal
 - Des voies aériennes inférieures sans compter les pneumopathies
 - Les articulations et les os
 - L'appareil génital
 - Les yeux
 - Le système cardiovasculaire
 - Le système nerveux central

2. Les pneumonies nosocomiales

2.1. Origine

Le développement de pneumonies chez des patients présentant déjà une autre pathologie n'est pas un phénomène nouveau. Provoquant une mort prématurée dans de nombreux cas, on la nommait jadis "the old man's friend", démontrant ainsi son rôle déterminant dans l'abrégement des souffrances humaines.

Néanmoins, la distinction entre une pneumonie classique ou de type lobaire et une pneumonie terminale ou nosocomiale ne se fera que bien plus tard par Sir William Osler. Eminent médecin anglais de la fin du 19^{ème} siècle, et précurseur de l'anatomo-pathologie, il va, grâce à une étude microscopique de lésions autopsiées, pouvoir mettre en évidence un nouveau type de pneumonie, retrouvée principalement lors de complications post-opératoires ou infectieuses. De type lobulaire, débutant par une intense réaction inflammatoire bronchiolaire, elle présente un diagnostic difficile qui, malheureusement, passe souvent inaperçu (Johanson and Dever, 2003).

2.2. Physiopathologie

2.2.1. *Généralités*

La pneumonie pourrait se définir comme l'infection et la solidification du parenchyme pulmonaire sous forme d'un mécanisme exsudatif. Elle est principalement due à la colonisation du tractus respiratoire supérieur par des bactéries potentiellement pathogènes qui, suite à une inhalation, sont aspirées vers le poumon, site d'une éventuelle infection. (Cotran et al., 1999). Néanmoins, d'autres portes d'entrée peuvent également être impliquées tels que l'inhalation de microorganismes depuis l'environnement extérieur, la dissémination sanguine à partir d'un foyer infectieux déjà présent ou même l'extension d'une espèce bactérienne à partir d'un site adjacent (Rubin and Farber, 1994).

Cependant, quel que soit le cas, la pneumonie s'installe souvent en réponse à un défaut des mécanismes de défense, comme c'est le cas pour la mucoviscidose ou à une diminution de l'immunité, rendant ainsi particulièrement sensibles les immunodéprimés et les patients atteints de maladies chroniques, d'infections virulentes ou suivant un traitement-immunosuppresseur.

La pneumonie peut se présenter sous différentes formes, d'où la nécessité d'établir une classification. Trois variables vont nous aider en ce sens (Cotran et al., 1999) :

- **L'agent étiologique** : différents types d'organismes pathogènes peuvent provoquer une pneumonie. On retrouve principalement les bactéries qui regroupent également les mycobactéries, les virus, et les champignons. Le mécanisme inflammatoire peut également varier suivant les espèces présentes dans chaque catégorie. Nous ne nous attarderons ici que sur les pneumopathies bactériennes, les autres n'intervenant pas dans le cadre de ce mémoire.
- **La nature de la réaction de l'hôte** : elle peut être fibrineuse ou suppurative.
- **La distribution anatomique** : on retrouve en effet les pneumonies de types lobaires, dont le champs d'action s'étend sur une large partie du lobe, et les bronchopneumonies ou pneumonies lobulaires qui apparaissent à travers de nombreux petits points d'infection, pouvant confluer par la suite (fig. I.2). C'est dans cette dernière catégorie que vont se regrouper les pneumonies nosocomiales.

La bronchopneumonie se caractérise par la formation d'un foyer purulent au niveau des bronches et des bronchioles qui, petit à petit, va se déverser au niveau de l'alvéole communicante donnant ainsi lieu à une pneumonie. L'addition de nouveaux foyers permettra tout doucement à l'infection de s'étendre (Cotran et al., 1999). Le caractère insidieux et progressif de cette maladie explique l'absence de symptomatologie vraiment caractéristique, contrairement à la pneumonie classique. Sans traitement, 10 jours sont nécessaires pour sortir de la phase aiguë ou crise et cela, dans le meilleur des cas. Un tiers des patients décèdent en effet d'insuffisance respiratoire (Rubin and Farber, 1994).

2.2.2. Symptomatologie

Divers symptômes peuvent néanmoins faire suspecter une pneumonie nosocomiale bien que, comme dit ci-dessus, ils ne soient pas exhaustifs.

- la présence d'expectorations purulentes pouvant ou non être associée à une toux
- une température de plus de 38°C ou de moins de 36°C
- une leucocytose c'est-à-dire un nombre de globules blancs supérieur à 12.000/mm³ ou une leucopénie, correspondant à moins de 4.000 GB /mm³ (Higgins, 1999).

La radiographie n'apporte malheureusement qu'une aide limitée dans la confirmation diagnostic, les points d'infection étant parfois de trop petites tailles pour être facilement décelable. Il arrive néanmoins qu'on puisse déceler un infiltrat évolutif, signe de la confluence des foyers, ou un épanchement pleural (Higgins, 1999);(Cotran et al., 1999).

2.2.3. Complications

La pneumonie peut parfois se compliquer en des pathologies très graves, d'où la nécessité d'un traitement immédiat et adapté. On retrouve principalement (Cotran et al., 1999; Higgins, 1999):

- **La pleurésie** : elle est due à une extension de la pneumonie au niveau de la plèvre
- **Un épanchement pleural**
- **Un pyothorax** : il résulte d'une infection au niveau de l'épanchement pleural
- **Un empyème** : conséquence d'un pyothorax non traité, il correspond à la formation d'un kyste fibreux, contenant du pus.

L'abcès pulmonaire et la bactériémie sont par contre très rares dans ce type de pneumonie.

2.3. Epidémiologie

Seconde pathologie nosocomiale la plus répandue après les infections urinaires, les pneumonies représentent environ 15% de toutes les infections acquises en milieu hospitalier. (Tablan et al., 1997). On observe 5 à 10 cas pour 1000 admissions, chiffre pouvant augmenter à 20 dans le cas de patients ventilés (Mandell and Campbell, 1998).

Néanmoins, nonobstant ce taux d'incidence relativement élevé, le danger de ce type de pneumonie est particulièrement bien illustré par son taux de mortalité, estimé à 30-33%. Il semble de plus que cette pathologie rend compte de 60% des décès dus à une infection nosocomiale. Ces chiffres ne laissent aucun doute sur l'énorme problème de santé publique que représente, à ce jour, ce type de pneumonie. L'augmentation des coûts, liée à l'hospitalisation prolongée inhérente à la maladie ne fait que renforcer cet état de fait (Tablan et al., 1997).

Touchant principalement les patients en soin intensif, la pneumonie nosocomiale fut souvent identifiée comme étant une pathologie post-opératoire. Des études épidémiologiques réalisées dans les années 70 ont démontrés que 75% des cas de pneumonies bactériennes étaient retrouvés chez des patients ayant subi une intervention chirurgicale. A ce niveau, le risque était 38 fois plus élevé dans le cas d'une thoracotomie ou d'une chirurgie abdominale que dans le cas de procédures impliquant d'autres parties du corps.

Actuellement, d'autres sources de contamination ont pu être mises en évidence telles que l'intubation endotracheale ou les respirateurs artificiels (Tablan et al., 1997).

2.4. Facteurs de risques et prévention

Vu l'importance des foyers de contamination en milieu hospitalier, on ne doit pas s'étonner du nombre considérable de facteurs de risque retrouvé au niveau des pneumonies nosocomiales (fig. I.3). Afin de simplifier leur étude, six catégories ont été mises en évidence à partir de plusieurs études de population (Tablan et al., 1997):

1. les facteurs inhérents à l'hôte
2. les facteurs favorisant la colonisation du pharynx ou de l'estomac par des microorganismes
3. les facteurs favorisant l'aspiration ou le reflux
4. les conditions requérant l'utilisation d'un respirateur artificiel ou impliquant l'utilisation d'un équipement respiratoire contaminé
5. les cas de contamination par les mains
6. les facteurs empêchant un déroulement normal de la fonction respiratoire

Notons qu'il s'agit ici des facteurs de risque impliqués dans les pneumonies bactériennes bien que, globalement, ils peuvent s'étendre à tous les types de pneumopathies. Le tableau ci-joint met néanmoins en évidence les quelques particularités (fig. I.4) inhérentes à chaque type d'agents pathogènes.

2.4.1. Les facteurs inhérents à l'hôte

Cette catégorie comprend essentiellement les éléments caractérisant l'état général du patient. On y retrouve essentiellement l'âge ainsi que tous les facteurs responsables d'une chute de l'immunité : maladie chronique, infections virulentes, immunodépression, traitement immunosuppresseur,.... (Cotran et al., 1999; Tablan et al., 1997).

2.4.2. Les facteurs favorisant la colonisation du pharynx ou de l'estomac par des microorganismes

Une relation positive entre les souches bactériennes colonisant le système digestif et les souches responsables de pneumonies nosocomiales ayant été mise en évidence (Garrouste-Orgeas et al., 1997; Tablan et al., 1997), il est bien évident que toute situation favorisant cet état de fait est un important facteur de risque. On peut citer à ce niveau l'administration d'antimicrobien aérosolisé ou d'antiacide, le coma, une admission en soins intensifs,.... Un moyen de réduire la colonisation bactérienne de l'estomac serait l'administration entérale de nourriture acidifiée (Tablan et al., 1997).

2.4.3. Les facteurs favorisant l'aspiration ou le reflux gastriques et oro-pharyngés

Après colonisation de l'estomac ou du pharynx, les agents pathogènes doivent être aspirés vers les voies respiratoires inférieures pour provoquer une pneumonie. Ce genre de situation peut, dans certains cas, être favorisé. On peut noter :

- Un faible niveau de conscience (augmentation de la régurgitation)
- La dysphagie suite à un désordre neurologique ou de l'œsophage
- La mise en place d'un tube endotrachéal, entéral ou tracheostomal
- L'administration de nourriture par voie entérale

Bien que la prévention soit difficile dans ce genre de cas, l'utilisation de méthode limitant la régurgitation (ex : mettre le patient dans une position semi-couchée) ou la suppression de l'administration entérale de nourriture en cas de grand volume résiduel stomacale ou de bruits intestinaux inaudibles peut donner de bons résultats (Tablan et al., 1997).

2.4.4. Les conditions requérant l'utilisation d'un respirateur artificiel ou d'un équipement respiratoire contaminé

Indépendamment de toute contamination du matériel, les patients sous respiration artificielle ont 6 à 21 fois plus de chance d'être atteint de pneumonies nosocomiales. Cette augmentation est due d'une part au transport des organismes de la flore oropharyngée vers la trachée lors de l'intubation endotrachéale, d'autre part à une diminution des défenses de l'hôte sous-jacente à la pathologie. De plus, les bactéries peuvent s'agréger et former un biofilm au niveau du tube ce qui les protègent de notre système immunitaire ou de l'action d'un antibiotique.

En ce qui concerne les dispositifs spécifiques au tractus respiratoire, il semble que ceux utilisés dans le cas d'examens diagnostics (bronchoscope, spiromètre,...), de thérapies respiratoire (nébulisateurs,...) ou d'anesthésies soient d'importants réservoirs potentiels de microorganismes, de même qu'ils peuvent favoriser leur transmission.

L'aspiration des sécrétions trachéales et la stérilisation du matériel restent les méthodes les plus traditionnellement utilisées dans la prévention des pneumonies (Tablan et al., 1997).

2.4.5. Les cas de contaminations par les mains

La transmission entre patients des différents microorganismes impliqués dans les pneumonies nosocomiales est souvent le fait d'une contamination via les mains du personnel soignant. La manipulation de tubes endotrachéaux ou d'appareillage spécifique au tractus augmente encore l'opportunité d'une contamination croisée. Ce risque peut être réduit en aseptisant le matériel et se lavant les mains de manière à éliminer tous les pathogènes (Tablan et al., 1997).

2.4.6. Les facteurs empêchant un déroulement normal de la fonction respiratoire.

On regroupe parmi cette catégorie les interventions chirurgicales impliquant la tête, la nuque, le thorax, la partie supérieure de l'abdomen ainsi que l'immobilisation résultant d'un

traumatisme ou d'une maladie. De telles situations peuvent en effet engendrer une perturbation de la déglutition et des mécanismes de clearance respiratoire. A ce niveau, il semble que certains patients soient plus sensibles à ce genre de complications pulmonaires post-opératoires. On y retrouve entre autre les personnes obèses, celles âgées de plus de 70 ans, les fumeurs, les patients atteints d'une infection pulmonaire chronique obstructive,...

Des méthodes préventives telles que les exercices respiratoires ou la physiothérapie permettent de réduire ce risque (Tablan et al., 1997).

2.5. Les agents pathogènes

Comme dit précédemment, nous ne attarderons que sur les pneumonies bactériennes. Il est néanmoins important de noter que des infections pulmonaires fongiques (ex : aspergillose) et virales rendent également compte d'une partie des pneumonies nosocomiales (Tablan et al., 1997).

Pour plus de facilités, les bactéries pathogènes vont être séparées en deux groupes, suivant la coloration bien connue de GRAM. Le cas de la légionellose sera traité à part (fig. I.5).

2.5.1. *Les GRAM positives*

Les bronchopneumonies purulentes sont essentiellement provoquées par des coques à Gram positif. On y retrouve principalement *Staphylococcus aureus* et *Streptococcus pneumoniae*.

2.5.1.1. Staphylococcus aureus

Appelé aussi staphylocoque doré, on le retrouve principalement au niveau de la peau et des muqueuses des voies respiratoires supérieures, digestives et même vaginales. Facilement véhiculé via les mains, l'air, les objets et les aliments, il est particulièrement résistant à la sécheresse, d'où sa capacité de survivre à l'air pendant plusieurs jours.

Potentiellement peu invasif, il n'est capable de franchir les barrières naturelles du corps qu'en cas de déficience de ces dernières. Son pouvoir pathogène lui vient essentiellement de son action fortement nécrosante, provoquée par la sécrétion abondante d'enzymes et de toxines et par l'action pyogène de la protéine A (Schaechter et al., 1999).

Principalement impliqué dans les pathologies de la peau, les voies respiratoires ne sont que rarement la porte d'entrée de *S. aureus*. Des pneumonies provoquées par ce type de bactéries se rencontrent cependant assez souvent chez les patients sous assistance respiratoire mécanique ce qui en fait, avec 13%, la deuxième espèce la plus impliquée dans la genèse des pneumonies nosocomiales (Suetens and Leens, 2002).

2.5.1.2. Streptococcus pneumoniae

Appelé aussi pneumocoque, cette espèce est une grande colonisatrice du système respiratoire supérieur de l'homme, principalement au niveau du pharynx. Très fragile, elle ne peut survivre ni dans le milieu extérieur, ni au niveau des muqueuses digestives.

N'exerçant son pouvoir pathogène qu'au niveau de brèches fonctionnelles, son principal facteur de virulence lui vient de la pneumolysine, une puissante endotoxine proinflammatoire. Contrairement à *S.aureus*, elle n'a aucune action nécrosante.

Comme dit précédemment, *S.pneumoniae* est un organisme pathogène impliqué principalement dans les pneumonies lobaires. Il ne provoque qu'assez rarement des bronchopneumonies qui résultent d'ailleurs davantage d'un mauvais terrain prédisposant plutôt que d'une agressivité particulière de la bactérie (Schaechter et al., 1999).

2.5.1.3. Les autres Gram +

D'autres espèces de Gram + peuvent également être impliquées dans la génèse de pneumonies nosocomiales. Nous n'en citerons que quelques-unes :

- ***Streptococcus oralis*** : germe pathogène de la flore buccale, bien qu'il puisse coloniser d'autres muqueuses, il prédomine surtout dans l'étiologie des endocardites lentes. On peut néanmoins le retrouver dans des cas de bronchopneumonies (Suetens and Leens, 2002; Whatmore et al., 2000).
- ***Enteroccus spp*** : principalement représentés par *E. faecalis* et *E. faecium*, il s'agit d'espèces peu virulentes dont les propriétés sont intermédiaires entre les staphylocoques et les streptocoques. Elles sont responsables de plus ou moins 1 à 2% des pneumonies nosocomiales (Suetens and Leens, 2002).

2.5.2. Les GRAM négatives

Elles représentent la majorité des germes pathogènes impliqués dans les pneumonies nosocomiales.

2.5.2.1. *Escherichia coli* et la flore de substitution

On regroupe sous le terme de « flore de substitution » toutes espèces bactériennes qui ont en commun les propriétés suivantes :

- Des propriétés bactériologiques voisines d'*Escherichia Coli*
- La capacité de remplacer *E.coli* au niveau de l'intestin humain, le vagin, l'urètre, la peau et le pharynx.
- La capacité de provoquer les mêmes infections qu'*E. Coli*.

On retrouve à ce niveau deux classes de bactéries

- **Les entérobactéries** : elles regroupent des bactéries telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Serratia spp*, *Citrobacter spp*, *Providencia spp*, *Morganella spp*, *Proteus vulgaris*,...*E. coli* est également classé dans cette catégorie.
- **Les non-fermentants** : on y retrouve *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Burkholderia cepacia*,...

Bactéries solides et peu exigeantes sur le plan nutritif, elles se caractérisent par de remarquables capacités d'adaptation et une résistance spontanée à de nombreux antibiotiques et désinfectants. D'où leur facilité de survie en milieu hospitalier.

Néanmoins, comme pour la plupart des pathogènes précédents, les bactéries de la flore de substitution ne possèdent pas de pouvoir invasif propre. Une brèche au niveau des tissus profonds est nécessaire pour qu'une infection se déclare (Schaechter et al., 1999). Ces germes étant particulièrement présents au niveau des patients hospitalisés, on en est arrivé à la

conclusion que ses brèches étaient très certainement dues à des instrumentations tels que la pose d'un cathéter, d'une sonde urinaire ou d'un tube endotrachéal ce qui explique le nombre important de sites infectieux. Les bronchopneumonies sont, quant à elle, essentiellement retrouvées au niveau de patients placés sous ventilation mécanique.

Au niveau des facteurs de virulence, notons l'importance de l'action pro-inflammatoire du lipopolysaccharide qui, par son passage au niveau du sang, peut provoquer un choc infectieux. Il est en général plus virulent chez les entérobactéries que chez les bacilles non-fermentants (Schaechter et al., 1999). A ce propos, il semble d'ailleurs que les pneumonies provoquées par le genre *enterobacter* aient un taux de mortalité plus élevé que celles provoquées par les autres bacilles Gram - (Sanders and Sanders, 1997).

2.5.2.2. *Pseudomonas aeruginosa*

Membre de la flore de substitution, *P.aeruginosa* est l'agent pathogène bactérien responsable de pneumonies nosocomiales le plus répandu en milieu hospitalier.

Particulièrement résistante aux antibiotiques et aux désinfectants et capable de survivre très facilement au niveau du milieu extérieur, il s'agit d'une espèce omniprésente dans notre environnement. Cependant, elle ne devient véritablement colonisatrice que dans certains cas d'immunodépressions tels que la prise d'antibiotique. Dans le cas des bronchopneumonies, c'est très souvent la destruction de la flore naturelle des bronches par une antibiothérapie qui provoque la colonisation par *P.aeruginosa*.

Provocant des infections très nécosantes, souvent caractérisées par des microhémorragies, il s'agit probablement d'une des bactéries les plus agressives et surtout l'une des plus difficiles à traiter (Schaechter et al., 1999).

2.5.2.3. *Haemophilus influenzae*

Seule espèce pathogène du genre *Haemophilus*, l'espèce *influenzae* colonise uniquement les voies respiratoires supérieures et la cavité buccale de l'homme.

Contrairement aux bacilles précédents, il s'agit d'une espèce très fragile et très exigeante qui peut se présenter sous deux formes :

- **Les souches capsulées**, très virulentes
- **Les souches non-capsulées**, peu virulentes

La souche impliquée au niveau des pneumonies nosocomiales est la non-capsulée. La fréquence assez élevée de ce germe dans ce type de pneumonie peut être expliquée d'une part par le nombre de porteurs (50% des gens en possèdent) et d'autre part, par la facilité avec laquelle cette espèce colonise le mucus (Schaechter et al., 1999).

2.5.2.4. Les autres GRAM -

D'autres espèces de GRAM -, tels que *Acinetobacter calcoaceticus*, *Proteus mirabilis* ou *Moraxella catarrhalis* peuvent également être impliquées dans ce genre de pneumonies (Suetens and Leens, 2002).

2.5.3. *Legionella* spp et la légionellose

Retrouvés essentiellement dans les milieux d'eau douce, *Legionellae* sont des bactéries intracellulaires, vivant communément en parasite dans certaines amibes. Quarante-huit espèces de *Legionella* ont été recensées à ce jour.

Souvent inhalé sous forme d'aérosols au niveau hospitalier, *legionella* se caractérise par un cycle infectieux particulier. Contrairement aux autres bactéries étudiées, il a la capacité de se répliquer à l'intérieur de nos cellules (Fields et al., 2002).

Bien qu'actuellement peu répandu dans le milieu hospitalier belge, il n'en est pas moins un agent pathogène redoutable, pouvant présenter un tableau clinique très grave. En effet, bien qu'entrant dans la catégorie des pneumonies nosocomiales, les légionelloses peuvent prendre la forme d'atteinte multisystémique très sérieuse (maladie du légionnaire). Leur taux de mortalité avoisine les 40% (Tablan et al., 1997).

Dans le nord des Etats-Unis, il semble que les cas de légionellose en milieu hospitalier représentent de 0 à 14% de l'ensemble des pneumonies nosocomiales. 90% des cas seraient provoqués par *legionella pneumophila*.

Cliniquement, il est malheureusement impossible de faire la différence entre la maladie du légionnaire et un autre type de pneumonie, les symptômes cliniques étant trop similaires. De plus, la radiographie ne fournit aucune information au niveau diagnostique. Ce dernier est souvent établi, soit par culture, soit par sérologie ou diagnostic moléculaire (Fields et al., 2002).

2.6. Traitement

Le traitement des pneumopathies bactériennes est essentiellement antibiotique. Il est évidemment déterminé en fonction de l'agent pathogène incriminé. Néanmoins, avant la mise en évidence de ce dernier par une des méthodes diagnostiques précitées, une antibiothérapie empirique est mise sur pied. Elle est fonction de la sévérité de la maladie, des facteurs de risques pour un pathogène spécifique et du moment où la maladie s'est déclarée. Par exemple, un patient atteint d'une pneumonie modérée et ne présentant aucun facteur de risques apparent sera traité préférentiellement par une monothérapie à base de céphalosporine ou fluoroquinolone. Les patients à haut risque, par contre, seront essentiellement traités par une antibiothérapie à large spectre (Higgins, 1999).

Le choix du bon antibiotique n'est pas toujours chose aisée. Le milieu hospitalier favorisant l'apparition de souches résistantes, la réalisation d'un antibiogramme au niveau de l'espèce incriminée est primordiale pour prescrire un traitement adéquat.

2.7. Méthode diagnostic

A ce jour, cinq méthodes sont communément utilisées pour tenter d'identifier les germes pathogènes impliqués dans les pneumonies nosocomiales :

- L'examen microscopique des crachats
- La culture d'agents pathogènes
- La détection d'antigènes
- Les tests sérologiques
- Le diagnostic moléculaire

La culture reste cependant la technique prédominante. Comme nous le verrons par la suite, peu de bactéries peuvent actuellement être détectées par une autre méthode (Kohno et al., 2004).

Notons que les critères cliniques, étant donné leur faible spécificité, ne peuvent en aucun cas constituer une méthode sûre. Ils doivent obligatoirement être confirmés par une autre analyse. Il en est de même pour la radiologie (voir point 2.2.2).

2.7.1. Examen microscopique direct des expectorations

Bien que l'identification bactérienne soit rarement réalisable par examen direct, il est néanmoins possible de classer ces agents pathogènes selon leur morphologie et leur affinité tinctoriale mise en évidence par une coloration de GRAM.

Suite à ces renseignements, le choix d'une antibiothérapie empirique ainsi que d'un système de détection plus adapté vont pouvoir être déterminés (Schaechter et al., 1999).

Néanmoins, cette technique est fortement influencée par certains facteurs, tels que l'objectivité de l'examineur, les méthodes de prélèvements, l'état du patient...ce qui en fait une méthode assez controversée. De plus, des contaminations par la flore commensale peuvent fausser le diagnostic, conduisant ainsi à la prescription inutile d'un traitement adapté (Konho et al., 2004).

2.7.2. La culture d'agents pathogènes

La culture d'agents pathogènes est actuellement la méthode diagnostique la plus utilisée. Elle nécessite des techniques de prélèvement adéquates. Ces dernières peuvent être classées en deux catégories :

- **les méthodes non-invasives** comprenant les expectorations (prélevées ou pas à l'aide d'un nébuliseur) et l'aspiration endotrachéale (Konho et al., 2004).
- **les méthodes invasives** comprenant essentiellement le lavage bronchoalvéolaire et le brossage bronchique protégé. Ces dernières, pouvant parfois présenter un danger pour le patient, ne sont utilisées que dans de graves cas de pneumonies où l'agent spécifique doit absolument être mis en évidence (Konho et al., 2004).

2.7.2.1. L'aspiration endotrachéale

Les sécrétions endotrachéales sont aspirées à l'aide d'une sonde d'intubation et, après visualisation à l'aide d'une coloration de GRAM, mises en culture. Le prélèvement doit être suffisamment fluide etensemencé suivant une dilution permettant un dénombrement de 10^5 colonies/ml. La mise en culture se fait par :

- Une gélose au sang
- Une gélose chocolat enrichie
- Des milieux de MacConkey pour les bactéries aérobies et anaérobies.

Les espèces bactériennes prédominantes sont alors identifiées par des techniques microbiologiques standards (Kirtland et al., 1997).

Une analyse quantitative peut également être réalisée à partir de sécrétions endotrachéales. Un seuil de pathogénécité d'une valeur de 10^6 colonies /ml est le plus souvent admis. Il peut néanmoins varier de 10^3 à 10^7 selon différents critères (Jourdain et al., 1995).

Le gros inconvénient de ce genre de technique est la contamination par la flore oropharyngée et bucco-salivaire. Néanmoins, elle est sans risque.

2.7.2.2. Le lavage bronchoalvéolaire

Cet examen consiste à introduire dans les conduits aériens supérieurs, un tube flexible permettant de visualiser l'intérieur de l'arbre respiratoire. Ce tube, ou fibroscope, va injecter plusieurs échantillons d'environ 50 ml de serum physiologique au niveau d'une bronche distale. Le liquide est ensuite réaspiré afin d'être analysé. L'étape de mise en culture est identique à l'aspiration endotrachéale.

Un dénombrement de germes supérieurs à 10^4 colonies/ml est considéré comme étant signe d'une pneumonie ((Mayhall, 2001).

L'avantage de ce genre de méthode est son haut taux de spécificité (60 à 100%) et de sensibilité (70 à 100%) (Tablan et al., 1997). Néanmoins, sa nature invasive pose parfois problème pour la santé du patient.

2.7.2.3. Le brossage bronchique protégée

Cet examen consiste à faire, au niveau du territoire atteint, un prélèvement à l'aide d'une petite brosse. Cette dernière, fixée à l'extrémité d'un guide métallique, est protégée par un cathéter obturé par un bouchon de polyéthylène glycol. C'est seulement au niveau de la bronche incriminée que le bouchon sera éjecté, évitant ainsi toute contamination. L'examen terminé, la brosse sera plongée dans l'eau stérile en vu de la mise en culture. L'étape de culture est de nouveau identique à l'aspiration endotrachéale. Le seuil de pathogénicité peut, dans ce cas, être abaissé à 10^3 colonies/ml (Mayhall, 2001).

La spécificité et la sensibilité de la technique sont du même ordre que pour le lavage broncho-alvéolaire.

Cependant, l'amélioration apportée par ce genre de méthodes ne supprime pas l'inconvénient de la durée du temps de culture, souvent de plusieurs jours.

2.7.3. La détection d'antigènes

Cette technique, basée sur la reconnaissance d'un antigène ou d'un métabolite spécifique à l'espèce, est essentiellement utilisée au niveau de prélèvements aseptisés tels que le liquide pleural.

Bien que cette méthode offre moins d'intérêt que les précédentes, sa spécificité étant assez faible, la spécificité au niveau des sécrétions tracheo-alvéolaires, de nouvelles techniques immunologiques permettraient, dans l'avenir, la détection directe d'endotoxines et d'enterotoxines bactériennes ce qui élargirait considérablement le champ d'investigation (Kohno, 2004; Schaechter et al., 1999).

2.7.4. Les tests sérologiques

Ils consistent en la mise en évidence d'anticorps synthétisés contre l'agent pathogène au niveau du sérum. Ce genre de méthode, plutôt lente et peu significative dans les premiers stades de la maladie, a surtout sa raison d'être dans la confirmation diagnostique au niveau épidémiologique (Konho et al., 2004).

2.7.5. Techniques de diagnostic moléculaire

On retrouve essentiellement à ce niveau les techniques de PCR et d'hybridation in situ. Rapides et très sensibles, ces méthodes ont l'avantage de résoudre le problème provoqué par les espèces difficilement cultivables (Kohno, 2004). Actuellement, certaines bactéries tels que *M.catharrhalis* (Greiner et al., 2003) ou *legionella* (Cloud et al., 2000; Hayden et al., 2001) font déjà l'objet de telles techniques.

Cependant, la méthode reste spécifique à chaque espèce et nécessite de refaire l'expérience pour chacune d'entre elles ce qui, vu le nombre de germes impliqués dans les pneumonies nosocomiales est un facteur limitant.

Le développement de techniques de multidétection tels que les biochips offre donc des perspectives très intéressantes.

3. Les biochips

3.1. Principe

La technique des biochips pourrait se définir comme une version miniaturisée de la technique "reverse dot blot" permettant l'analyse qualitative ou semi quantitative de plusieurs séquences d'acides nucléiques simultanément.

Comme nous le verrons par la suite, cette technique présente de nombreuses variantes tant au niveau de l'origine des molécules cibles qu'au niveau des supports utilisés ou des techniques de mises en évidence. Le principe général reste néanmoins identique (fig I.6). Les acides nucléiques (ADN ou ARN), isolés à partir d'un échantillon biologique, sont marqués via leur nucléotide et hybridés au niveau de sondes trappeurs immobilisées sur un support défini et occupant une localisation spécifique appelée **spot**. Cette étape d'hybridation se base sur la complémentarité des bases nucléotidiques, mise en évidence par Watson et Crick (Matson and Rampal, 2003; Watson and Crick, 1953). L'identité ou la quantité de l'acide nucléique incriminé sera finalement mis en évidence grâce à diverses méthodes de détection (Zammatteo et al., 2002a). Ces différentes étapes seront détaillées dans les points suivants.

3.2. Elaboration d'une biochips

La construction d'une biochips adaptée à l'application désirée représente la première étape de la procédure. Trois phases peuvent être mises en évidence à ce niveau : le choix du support, le mode de fixation des ADN trappeurs sur ce support et leur mode d'adressage.

3.2.1. Choix du support

Celui-ci a beaucoup varié avec les années et les progrès technologiques. Les premiers types de supports à avoir été mis sur le marché sont les membranes de nitrocellulose et de nylon. Bien qu'encore utilisées actuellement, elles se sont néanmoins effacées devant les lames de verre, devenues le support standard. Leur compatibilité avec les différentes procédures de fabrication, leur faible fluorescence et leur haute résistance à haute température en font un outil simple et bien adapté (Zammatteo et al., 2002a; Zammatteo et al., 2000). De

plus, elles offrent l'avantage d'éviter une diffusion des ADN cibles au niveau du support, permettant ainsi aux acides nucléiques d'avoir directement accès aux sondes trappeurs (Southern et al., 1999).

L'utilisation de polymères autofluorescents tels que le polycarbonate était à ce jour fort compromise, la fluorescence étant jusqu'à peu la principale technique de détection. Néanmoins, l'avènement de la coloration à l'argent permettrait dorénavant de tester l'efficacité de ce type de support (Alexandre et al., 2002).

Actuellement, la mise au point d'un support électronique pourrait encore offrir de nouvelles perspectives (Alexandre et al., 2002).

3.2.2. Fixation des ADN trappeurs

Une fois le support sélectionné, les sondes trappeurs doivent ensuite y être fixées de manière à être accessibles lors de l'hybridation. A ce niveau, deux types d'approches peuvent être mises en évidence : les méthodes de couplages non covalentes et les méthodes de couplage covalentes.

3.2.2.1. Les méthodes de couplage non-covalentes

Il existe plusieurs variétés de ce type de couplage tels que les interactions hydrophobes (Allemand et al., 1997) ou les interactions électrostatiques par la polylysine (Skena et al., 1995). L'inconvénient de ce genre de méthode est que les sondes risquent de se détacher sous haute température ou forte concentration saline. D'où l'intérêt des méthodes de couplage covalentes.

3.2.2.2. Les méthodes de couplage covalentes

Ces méthodes sont, de loin, les plus utilisées. Le support est en fait modifié afin d'y introduire des fonctions spécifiques telles que des groupements époxydes (Lamture et al., 1994), aminés (Ghosh and Musso, 1987), isothiocyanate (Guo et al., 1994) ou aldéhydes (Skena et al., 1996). Capables de se lier de manière covalente au niveau de la sonde d'ADN, ils vont permettre la fixation de cette dernière au niveau du support. Deux cas principaux peuvent s'envisager.

Dans le cas d'une fixation de la sonde sur toute sa longueur, le procédé habituellement mis en exergue consiste en la liaison des résidus thymidines de l'ADN avec des groupements aminés positivement chargés de la lame fonctionnalisée (Duggan et al., 1999). Néanmoins, l'inconvénient de ce genre de méthode est que, d'une part, le nombre de site de fixation à l'ADN n'est pas défini et que d'autre part, les séquences disponibles lors de l'hybridation peuvent varier suivant les conditions de fixation (Zammatteo et al., 2000).

Une autre alternative est la fixation de l'ADN par son extrémité, méthode présentant l'avantage d'optimiser l'accessibilité de ce dernier lors de l'hybridation. Actuellement, la méthode la plus couramment utilisée consiste à lier l'extrémité amino-terminale d'un oligonucléotide aux groupements aldéhydes de la lame fonctionnalisée (Skena et al., 1996) (fig. I.7).

3.2.3. Mode d'adressage des ADN trappeurs

Deux types de méthodes sont à ce jour utilisées : la synthèse "in situ" , méthode par laquelle les ADN trappeurs sont directement assemblés au niveau du support et la microdéposition.

3.2.3.1. La synthèse in situ

Ce procédé consiste à synthétiser directement les ADN trappeurs au niveau du support. La photolithographie, mise au point par "Lipschutz et al", est, à ce niveau, la stratégie la plus efficace, notamment dans le cas de biochips à haute densité. Réalisée sur lame de verre, cette méthode utilise des nucléotides porteurs d'un groupement photolabile protecteur qui, soumis à une exposition lumineuse, vont libérer un hydroxyle réactif. L'intérêt d'utiliser la lumière comme agent actif dans la réaction de synthèse réside surtout dans le fait que chaque site peut ainsi être isolé de manière spécifique à l'aide d'un masque photolithographique. Les deoxynucléosides suivants, également porteur d'un groupement photolabile, seront ensuite incubés au niveau du support et se fixeront au niveau des sites illuminés dans l'étape précédente. Le même procédé est répété jusqu'à synthèse complète des différents ADN trappeurs (Lipshutz et al., 1999)(fig. I.8).

Une autre alternative, mise au point par "Matson et al", résiderait dans l'utilisation de films de polymères (Matson et al., 1994).

Ce genre de méthode présente néanmoins un inconvénient. La taille des ADN trappeurs ne peut en effet pas dépasser 25 paires de bases, d'où l'intérêt de la technique suivante, la microdéposition.

3.2.3.2. La microdéposition

La microdéposition consiste à déposer mécaniquement les trappeurs présynthétisés par PCR ou par synthèse chimique, au niveau du support. Deux méthodes peuvent être utilisées dans ce sens. La première consiste en un dépôt passif de la solution d'ADN trappeurs au niveau de sites préselectionnés. Cette opération s'effectue à l'aide d'une aiguille. Le deuxième procédé fait appel à un système de type « jet d'encre » qui va projeter l'ADN au niveau du support (Medlin, 2001).

Cette méthode présente des avantages certains. Outre le fait que les ADN trappeurs ne soient sujets à aucune restriction au niveau taille, ce type de procédé permet l'utilisation de n'importe quelle type de molécules (lipides, anticorps, hydrate de carbone,...) (Zammatteo et al., 2002a).

3.3. Hybridation de l'ADN cible

3.3.1. Principe

L'hybridation repose sur le principe d'appariement de bases complémentaires, mis en évidence par Watson et Crick (fig. I.9).

Pour rappel, la double hélice d'ADN est constituée de deux ADN simple brin rassemblés suite à la formation de ponts hydrogènes entre les différentes bases nucléotidiques, l'adénine se liant à la thymine et la cytosine à la guanine. Cette propriété de l'ADN simple brin de pouvoir lier son complémentaire va donc permettre de mettre spécifiquement en évidence le

gène voulu. A cette fin, une séquence trappeur au niveau d'un de ces deux brins devra être sélectionnée. Si le gène désiré est bien présent au niveau de la solution d'ADN cible, il s'hybridera au trappeur qui lui sera directement complémentaire.

Une étape de dénaturation est néanmoins nécessaire afin de briser les ponts hydrogènes maintenant la double hélice de l'ADN cible, produisant ainsi des ADN simple brins capables de s'hybrider au niveau du trappeur. La chaleur ou les solutions alcalines tels que le NaOH sont de bons agents dénaturants.

Deux étapes peuvent être définies au niveau de la réaction d'hybridation. On a tout d'abord la phase de nucléation où l'on observe une reconnaissance hasardeuse de type essai-erreur au niveau de courtes séquences nucléotidiques. Vient ensuite la phase de propagation de l'hélice, phase au niveau de laquelle les séquences situées entre deux sites de nucléation vont s'associer par pont d'hydrogène et reformer ainsi une double hélice.

3.3.2. Paramètres influençant l'hybridation

Plusieurs paramètres peuvent influencer la réaction d'hybridation. On retrouve parmi les plus importants : la température, la concentration en sels, le % en GC et la taille de l'ADN cible.

3.3.2.1. La température d'hybridation

Celle-ci est déterminée d'après la température de fusion (T_m), valeur à laquelle 50% des brins sont hybridés. Communément, la température d'hybridation est située 10°C en-dessous de celle de fusion. Le choix d'une température optimale est crucial pour une hybridation spécifique. Une température trop basse diminuerait en effet l'efficacité de la nucléation tandis que trop haute, elle empêcherait la formation de ponts hydrogène (Marmur, 1994).

On peut jouer sur ce paramètre pour augmenter la spécificité de l'hybridation, la formation d'un hétéroduplex étant plus difficile à haute température.

3.3.2.2. La concentration en sels

La présence d'une haute concentration en sels augmente la formation d'hétéroduplex. En effet, les cations annulent les charges négatives des phosphates, responsables de la répulsion entre les brins d'ADN (Zammatteo et al., 2002a).

Une faible concentration en sels augmente donc la spécificité d'appariement.

3.3.2.3. Le % en GC

La liaison entre une guanine et une cytosine, caractérisées par la formation de 3 ponts hydrogènes, est plus stable que celle retrouvée entre l'adénine et de la thymine, liées par seulement deux ponts. Cette stabilité va favoriser l'hybridation des hétéroduplexes en optimisant la nucléation, adepte des régions G-C (Zammatteo et al., 2002a). De plus, le risque de dénaturation par la chaleur ou par des lavages plus stringents est relativement diminué chez les hybrides riches en liaison GC.

3.3.2.4. La taille de l'ADN cible

Plus l'ADN est long, plus l'étape de nucléation est facilitée. La vitesse d'hybridation est en effet proportionnelle au logarithme de la longueur de l'ADN.

3.4. Technique de détection

La technique des biochips nécessite des procédures de marquage adéquates pour visualiser les résultats de l'hybridation. Trois techniques principales sont à ce jour utilisées : la radioactivité, la fluorescence, et la colorimétrie.

3.4.1. La radioactivité

Essentiellement d'application au niveau des membranes de nylon, ce genre de méthodes est de moins en moins utilisées aujourd'hui, de par sa toxicité ainsi que par sa complexité d'utilisation.

3.4.2. La fluorescence

Il s'agit certainement de la méthode la plus utilisée dans le marquage de l'ADN destiné à être hybridé sur biochips. Bien adaptée aux supports de verre en vigueur actuellement, elle présente deux stratégies de détection : une directe et une indirecte.

Dans la méthode directe, des nucléotides couplés à un groupement fluorophore sont directement incorporés au niveau de l'ADN à détecter. La méthode indirecte, par contre, utilise des nucléotides biotinylés reconnus par une streptavidine couplée à un fluorophore (Skena et al., 1996).

La lecture des résultats se fait à l'aide d'un scanner confocal, équipement très coûteux qui rend difficile l'utilisation d'un tel matériel au niveau d'une pratique clinique routinière (Alexandre et al., 2001; Zammattéo et al., 2002a).

3.4.3. La colorimétrie

Le coût de la fluorescence posant problème dans une pratique journalière, des méthodes alternatives ont dès lors été proposées. La colorimétrie s'est posée comme un choix intéressant. "Chen et al" proposèrent une méthode de détection utilisant la peroxydase et la phosphatase alcaline (Chen et al., 1998). Mais elle est malheureusement limitée au niveau sensibilité.

Il semble finalement que la technique colorimétrique la plus adaptée soit la coloration à l'argent. Le principe est simple : des nucléotides biotinylés, incorporés au niveau de l'ADN à détecter, sont mis en présence de streptavidine couplée à de l'or colloïdal. Le réactif d'argent ajouté va alors précipiter en argent métallique, suite à l'action autocatalytique de l'or. Cette précipitation va entraîner une variation de taille pouvant aller de 10 à 100 fois au niveau des particules aurifères (fig. I.10).

Outre le coût plus abordable des appareils de détection, cette méthode a l'avantage de présenter une sensibilité identique à la fluorescence. De plus, la stabilité de cette coloration permet le stockage et la conservation des lames pour une très longue période (Alexandre et al., 2001).

3.5. Classification suivant l'application

Les biochips peuvent être subdivisées en minimum deux catégories suivant le matériel utilisé et le degré de quantification requis. On retrouve d'une part la chips "à expression de gènes" fournissant une analyse semi-quantitative de l'ARN messager et d'autre part la chips "à ADN", dont le rôle est d'analyser qualitativement l'ADN génomique ou l'ARN.

3.5.1. La biochips "à expression de gènes"

Cette approche permet essentiellement une comparaison des profils d'expression géniques au niveau de deux populations cellulaires, l'une servant de contrôle, l'autre subissant les test souhaités (fig. I.11).

A partir d'ARN_m extrait du tissu voulu, une population d'ADN_c va être synthétisée et marquée suite à une transcription inverse. Elle sera ensuite hybridée au niveau de la biochips. Ces étapes seront réalisées dans le cas des deux situations à comparer. Une quantification des signaux à l'aide d'un scanner à fluorescence suivi du calcul de leur rapport va permettre de conclure soit à une activation, soit à une répression des gènes étudiés au niveau des deux situations. Notons que l'hybridation des deux populations d'ADN_c peut avoir lieu sur la même chips pour autant que les méthodes de marquage soient différentes suivant les cas (Matson and Rampal, 2003; Zammattéo et al., 2002a).

L'analyse de l'influence d'un médicament au niveau d'une population cellulaire désirée est un beau modèle d'application de ce type de biochips (de Longueville et al., 2002).

3.5.2. La biochips "à ADN" ou biochips diagnostic

Elle a pour but de déterminer la présence ou l'absence de séquences d'acide nucléique particulière.

Cette analyse nécessite au préalable une étape d'amplification enzymatique (ex : PCR), la quantité d'acides nucléique n'étant d'ordinaire pas suffisante pour être directement détectée par hybridation. Tout comme pour la biochips "à expression de gènes", l'hybridation du produit amplifié permettra ensuite, de par la disposition spécifique des spots, la visualisation de la séquence incriminée. Les méthodes de détection utilisées à ce niveau sont la coloration à l'argent et la fluorescence.

Ce type de biochips couvre principalement deux domaines de recherche particuliers : la détection de polymorphisme génétique et la mise en évidence d'agents infectieux.

3.5.2.1. La détection de polymorphisme génétique

Actuellement, l'intérêt de ce type de méthode réside surtout dans la détection de mutations génétiques présentant un facteur de risque dans le développement d'une pathologie quelconque (Zammattéo et al., 2002a). C'est le cas du cancer, particulièrement concerné par ce type de diagnostic. Prenons le cas du cancer du sein. Il est aujourd'hui acquis que des mutations, insertions ou délétions au niveau des gènes BRCA₁ et BRCA₂ favorise son apparition. La mise au point d'une biochips mettant en évidence ce type d'anomalie offre désormais de grands espoirs (Favis et al., 2000).

Il en est de même pour la protéine p53, un suppresseur de tumeur, muté dans presque 50% des cancers. Une chips, développée par Affymétrie (Wen et al., 2000) a permis la détection de plus de 400 mutations à tendance cancéreuse au niveau de la séquence codant pour la protéine p53.

L'intérêt des biochips au niveau cancéreux ne se limite cependant pas au domaine préventif. L'identification des gènes MAGE-A, d'origine spécifiquement tumorale et donc susceptible d'être ciblé par un anticorps, va leur octroyer un véritable rôle thérapeutique (Zammatteo et al., 2002b).

Néanmoins, l'utilisation des biochips en tant qu'outil préventif ou thérapeutique n'est pas limité au domaine des tumeurs. Son application au niveau des maladies cardio-vasculaires (Nabel, 2003) et des maladies neurodégénératives (Orum et al., 1999) offre également de grands espoirs.

3.5.2.2. La mise en évidence d'agents infectieux

L'identification du genre bactérien, de l'espèce et de leur résistance à certains antibiotiques sont les principaux terrains d'application de ce type biochips. Plus rapide que les méthodes de culture traditionnelles, cette technique aurait pour but de favoriser la précocité du traitement et par ce fait de réduire la pression de sélection par les antibiotiques, favorisées par l'administration d'une thérapie empirique inappropriée.

Des telles biochips, comme par exemple celles permettant l'identification de mycobactéries (Fukushima et al., 2003), de staphylococci ainsi que de leur gènes de résistance à la méthiciline (Hamels et al., 2001) et même de la souche 0157 : H7 de E.coli (Call et al., 2001) ont, à ce jour, déjà été mises au point.

C'est au niveau de ce dernier point que ce mémoire va s'intégrer.

II. Objectif

Objectif du mémoire

L'objectif de ce mémoire est de développer une biochips à ADN qui permettrait d'identifier les 20 principaux germes pathogènes bactériens impliqués dans les pneumonies nosocomiales.

Très grave, ce type de pneumonies représente un gros problème de santé publique tant par leur fréquence et leur taux de mortalité élevé que par les coûts importants qu'elles génèrent. Les méthodes diagnostiques actuelles passant la plupart du temps par une étape préalable de culture cellulaire, le temps nécessaire pour l'obtention des résultats est de l'ordre du jour, parfois de la semaine. De plus, seules les méthodes diagnostiques invasives présentent des taux de spécificité et de sensibilité vraiment intéressants. En ce qui concerne les techniques de diagnostic moléculaire, elles ne détectent malheureusement qu'un nombre restreint d'espèces.

L'intérêt de développer ce type de biochips résiderait non seulement dans sa sensibilité et sa spécificité mais aussi dans sa rapidité qui permettrait ainsi de prescrire promptement un traitement adapté.

La réalisation de ce type de biochips peut se résumer en cinq étapes (fig II.1).

La première consiste en la détermination d'un marqueur moléculaire. Le but va être de sélectionner une séquence qui va permettre l'identification des principaux agents pathogènes cibles. Cette dernière doit d'une part être suffisamment conservée pour permettre son amplification chez toutes les espèces, si possible, en une PCR unique et d'autre part présenter une hétérogénéité suffisante pour permettre de sélectionner une séquence spécifique à chaque espèce.

La sélection d'amorces consensus permettant l'amplification d'un fragment du gène marqueur au niveau des différentes espèces constituera le deuxième point.

L'amplification par PCR du marqueur préalablement déterminé constituera la troisième étape. Une mise au point des conditions PCR sera nécessaire pour que la séquence délimitée par les amorces consensus puisse être amplifiée au niveau de toutes les espèces. Le fragment obtenu sera ensuite séquencé afin de sélectionner des sondes de capture spécifique à chaque espèce.

La détection des ADN cibles par hybridation sur biochips constituera la dernière étape. Le but consistera à hybrider les différents produits PCR au niveau des séquences trappeurs sélectionnées et fixées au niveau d'un support afin d'en tester la spécificité et la sensibilité. Une mise au point des conditions d'hybridation sera nécessaire pour optimiser les réponses obtenues. Les résultats seront visualisés par une technique de coloration à l'argent.

III. Matériel et méthode

1. LA PCR

1.1. Principe

La PCR est une technique d'amplification enzymatique capable d'accroître, de manière exponentielle, le nombre de copie d'une région d'ADN spécifique. Son principe se base d'une part sur l'utilisation d'une polymérase, enzyme thermostable capable de recopier un ADN simple brin et d'autre part sur la présence de séquences oligonucléotidiques situées de part et d'autre de la région désirée et servant de ce fait d'amorce à la réaction de polymérisation.

Trois étapes, répétées de manière cyclique, peuvent être décrites au niveau de la PCR (fig. III.1):

- la dénaturation de l'ADN cible, rendant les brins accessibles aux amorces
- l'hybridation des séquences oligonucléotidiques
- la polymérisation de la séquence

Chacune de ces différentes phases est caractérisée par une température en adéquation avec sa fonction.

L'incorporation de dNTPs biotinylés, en place des dNTPs traditionnels, est propre aux produits PCR destinés à être hybridés, la biotine se révélant être un des éléments essentiels de l'étape de détection.

D'un point de vue pratique, l'échantillon destiné à être amplifié se prépare en deux étapes. Dans un premier temps, un mélange comprenant tous les composés nécessaires à la réaction, excepté l'ADN génomique, est réalisé au niveau d'une pièce appelée PCR1. Ce dernier n'est rajouté que dans un deuxième temps, en PCR2. Ces précautions permettent de déterminer l'origine d'une éventuelle contamination.

L'ajout d'uracil DNA glycosylase permet également de réduire le risque de contamination. Cet enzyme hydrolisent les liens désoxyuridiques de l'ADN, détruisant ainsi les éventuelles amplicons contaminants présents en PCR1 ou en PCR2. Néanmoins, son utilisation diminuent l'efficacité de la PCR.

Deux types de PCR vont être réalisées à notre niveau : une PCR dont le but sera d'amplifier le gène marqueur au niveau des différentes espèces et une PCR biotinylée, dont les produits seront hybridés.

1.2. Matériel

- Polymérase ULTRATOOLS 1U/μl (B&M labs, Espagne)
- Tampon 10X pour ULTRATOOLS (B&M labs, Espagne)
- MgCl₂ 50 mM pour ULTRATOOLS (B&M labs, Espagne)
- dNTPs 100mM (Roche, Allemagne)
- dATP biotinylés 1 mM (Roche, Allemagne)
- dCTP biotinylés 1mM (Roche, Allemagne)
- Uracyl DNA glycosylase 1 U/μl (Roche, Allemagne)
- Amorces 200μM (Eurogentec, Belgique)
- H₂O stérile
- PCR relaction tube 0,2 ml (CM LAB, Danemark)
- Appareil PCR : MJ Research PCT-225 peltier Thermal Cycler (Biozym, Hollande)
- Hotte captain bio (Erlab, France)
- ADN génomique des différentes souches bactériennes impliquées. Ils nous ont été procurés par le laboratoire de technologies moléculaires appliquées (UCL,

Bruxelles) ainsi que par la DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen).

1.3. Méthode

La procédure se déroule en deux étapes : la préparation de l'échantillon et le lancement du programme PCR.

1.3.1. Préparation de l'échantillon

1.3.1.1. En PCR1

A l'exception de l'ADN génomique, les différents composants intervenant dans la réaction de polymérisation sont amalgamés au niveau de tubes adaptés à l'appareil PCR. Ce mélange réactionnel, d'un volume totale de 50µl, se compose de :

- **Dans la PCR normale**
 - 200 µM de dATP, dCTP, dGTP
 - 200 µM de dUTP
 - Tampon PCR 0,3 X
 - 4mM de MgCl₂
 - 1,5 U d'ultratools
 - 0.5 µM d'amorces
- **Dans la PCR biotinylée**
 - 200 µM de dGTP
 - 150 µM de dATP et de dCTP
 - 400 µM de dUTP
 - Tampon PCR 0.3X
 - 4mM de MgCl₂
 - 1,5 U d'ultratools
 - 50 µM de dATP et de dCTP biotinylés
 - 1 U d'uracil DNA glycosylase
 - 0,5 µM d'amorces

1.3.1.2. En PCR2

L'ADN génomique est ajouté à raison de 25ng par réaction.

1.3.2. Lancement du programme PCR

Les différents tubes sont insérés au niveau de l'appareil PCR et le programme ci-dessous est encodé.

- 10 minutes à 22°C
- 5 minutes à 95°C
- 35 cycles : - 30 secondes à 94°C

- 30 secondes à 55°C
- 1 minutes à 72°C
- 10 minutes à 72°C
- Stopper la réaction à 4°C

Une fois le programme terminé, les échantillons sont stockés à – 20°.

2. Electrophorèse sur gel d'agarose

2.1. Principe

Cette technique consiste à séparer les brins d'ADN en fonction de leur taille. Elle se réalise entre autre après la PCR afin d'en visualiser les résultats. Un petit volume du produit est en fait déposé au niveau d'un gel de polymères d'agarose qui, soumis à un champs électrique, va engendrer la migration, suivant leur taille, des fragments préalablement amplifiés. Le résultat sera visualisé à l'aide d'une solution de bromure d'éthidium, substance fluorescente sous ultraviolet et capable de s'insérer entre les bases d'ADN. Ajoutée lors de la préparation du gel, elle marquera l'ADN qui dès lors pourra être visualisé sous banc U.V.

Notons que la co-migration d'un marqueur de poids moléculaire est indispensable pour évaluer la taille des différents fragments. De plus, il est également possible d'en estimer la concentration en comparant l'intensité des bandes du produit PCR avec celles d'un marqueur de poids moléculaire adapté à la quantification.

2.2. Matériel

- Agarose electrophoresis grade (Invitrogen, UK)
- Tampon TBE 10X dont la composition est
 - 1 M de Tris-HCl (Merck, Allemagne)
 - 0,9M d'acide borique (Merck, Allemagne)
 - 10mM d'EDTA 0,5M pH 8
- Bromure d'éthidium 500µg/ml (Sigma, USA)
- Load Dye 6X (Promega, USA)
- Marqueur de poids moléculaire Smart ladder (Eurogentec, Belgique) (fig. III.2)
- Cuve d'électrophorèse Horizon 11.14 (Gibco Brl, USA) (fig. III.3)
- Générateur EPS 500/400 (Pharmacia, Suède)
- Lampe U.V. (Vilber-Lourmat, France)
- Appareil photo Kaiser RA1 + Photo-print IP-001-SD (Vilber-Lourmat, France)
- Film K65HM (Mitsubishi, Japon) + Imprimante P91 (mitsubishi, Japon)

2.3. Méthode

2.3.1. *Préparation du gel d'agarose 1%*

L'agarose est pesé, à raison de 1 g, et mélangé à 100 ml de tampon TBE 1X. Une fois dissoute à haute température, la solution est refroidie et 20µl de bromure d'éthidium y sont ajoutés. Elle peut dès lors être coulée au niveau du moule adapté à la cuve d'électrophorèse. Notons, à ce niveau, la nécessité d'ajouter préalablement des peignes, qui formeront les puits dans lesquels les échantillon seront déposés. Après plus ou moins 30 minutes, le gel est polymérisé et prêt à être utilisé.

2.3.2. *Migration des échantillons*

Avant toute chose, 5µl de produits de PCR sont prélevés et dilués deux fois dans de l'eau distillée. Deux microlitres de Load Dye sont ensuite ajoutés afin de permettre aux échantillons de bien se déposer au fond du puit.

Le gel polymérisé est, quant à lui, disposé au niveau de la cuve préalablement remplie de tampon TBE 1X. Les différents échantillons ainsi que 5µl de marqueur de poids moléculaire sont alors déposés au niveau des puits, révélés après que les peignes aient été retirés.

Après 50 minutes de migration à 110 volts, les résultats peuvent être visualisés sous rayons U.V.

3. Purification d'un produit PCR ayant migré sur gel d'agarose 1%

3.1. Principe

Cette technique consiste à purifier un produit PCR en extrayant au niveau du gel d'agarose le fragment correspondant à la taille attendue.

Mis en présence d'une membrane de silice capable d'absorber l'ADN en présence d'une haute concentration en sels, ce fragment pourra dès lors être débarrassé, à l'aide de différents lavages, de tous ses contaminants qui, eux, ne possèdent pas cette propriété. Ces derniers éliminés, il ne restera plus qu'à éluer l'ADN prisonnier de la membrane à l'aide d'eau stérile.

3.2. Matériel

- Gel d'agarose 1% (voir point 2.2)
- Kit d'extraction Wizard SV gel and PCR clean-up system (Promega, USA)
- Microtube de 1.5 ml (Eppendorf, Allemagne)
- Balance (Analis, Belgique)
- Centrifugeuse (Biofuge pico, Allemagne)
- Produit PCR

3.3. Méthode

La première étape consiste à faire migrer l'entièreté du produit PCR, correspondant à plus ou moins 42 µl auxquels 7 µl de Load Dye ont été rajouté, au niveau d'un gel d'électrophorèse 1%. Cette migration de deux heures à 110 volts va permettre une séparation optimale des différentes bandes présentes au niveau du produit PCR. Le temps écoulé, le gel sera visualisé sous U.V. et la bande d'intérêt découpée et déposée dans un microtube de 1.5 ml. Préalablement pesé, il permettra après une seconde mesure, suivant le remplissage, de déterminer le poids exact du morceau de gel.

Une fois la masse déterminée, le fragment sera dissous à 65°C dans une solution favorisant la liaison de l'ADN à la membrane de silice. Le volume ajouté sera équivalent à 10 µl de solution/ 10 mg d'ADN. Le produit de dissolution sera ensuite transféré dans la colonne contenant la membrane et, après 1 minute d'incubation à température ambiante, centrifugée durant 1 minute. Le produit de l'opération, récolté au niveau d'un tube collecteur au niveau duquel la colonne est insérée, est ensuite éliminé.

Une centrifugation, après ajout de 700µl, puis de 500µl d'une solution à base d'éthanol permet à la membrane d'être débarrassée de toutes impuretés résiduelles. Notons que l'étape de centrifugation suivant le deuxième lavage se prolonge durant 5 minutes afin d'éliminer toute trace d'éthanol pouvant interférer avec le séquençage.

La dernière étape consistera à éluer l'ADN prisonnier de la membrane de silice avec 30µl d'eau. Le tout sera récolté au niveau d'un microtube de 1,5 ml préalablement annoté.

4. Séquençage

4.1. Principe

Le séquençage des produits PCR purifiés va permettre soit d'établir la séquence du fragment d'ADN, soit de la vérifier dans le cas où la séquence théorique est connue.

Son principe se base sur l'utilisation de didésoxynucléotides. Contrairement à des désoxynucléotides normaux, ces derniers sont dépourvus de groupements hydroxyles en 3' ce qui les empêchent de lier le nucléoside suivant.

Une PCR de séquençage est donc réalisée en présence du fragment amplifié, des 4 désoxynucléotides normaux, des 4 didésoxynucléotides, chacun couplé à une molécule fluorescente différente et de l'une des deux amorces ayant servi à amplifier le fragment.

Les didésoxynucléotides s'inséreront donc au hasard au niveau des chaînes d'ADN en synthèse ce qui donnera lieu à la formation de fragments de longueurs différentes, chacun étant terminé par un didésoxynucléotide couplé à sa molécule fluorescente.

La migration de ces échantillons au niveau d'un gel d'acrylamide permettra ensuite de séparer ces différents fragments à la base près. Le gel sera alors balayé par un laser, excitant ainsi les différentes molécules fluorescentes qui réémettront de la lumière à leur longueur d'onde spécifique. L'analyse de la succession des émissions, correspondantes chacune à un nucléotide, permettra de déterminer la séquence des amplicons.

4.2. Matériel

- Bigdye terminator cycle sequencing ready reaction kit with amplitaq DNA polymerase (Applied biosystem, USA)

- Amorces sens et antisens à une concentration de 10 μ M (Eurogentec, Belgique)
- Fragments d'ADN purifiés
- Eau distillée
- Appareil PCR : MJ Research PCT-100 peltier Thermal Cyclers (Biozym, Hollande)
- Appareil de lecture du gel d'acrylamide ABI.PRISM 377 DNA sequences (Applied biosystem, USA)
- Gel d'acrylamide 4%

4.3. Méthode

Le mélange PCR suivant est tout d'abord préparé :

- 6 μ l de tampon tris-HCl 200mM / MgCl₂ 5mM pH9
- 2 μ l de Ready Reaction Mix (didésoxynucléotides terminateurs, dNTPs, ampliTaQ polymérase, MgCl₂ et tampon Tris-HCl pH 9)
- 1 μ l d'amorces à une concentration de 10 μ M (sens et antisens dans des tubes différents)
- 2 à 4 μ l d'ADN (la quantité est fonction de la taille de la séquence).

| paire de base | Quantité |
|---------------|-----------|
| 100-200 pb | 1-3 ng |
| 200-500 pb | 3-10 ng |
| 500-1000 pb | 5-20 ng |
| 1000-2000 pb | 10-40 ng |
| > 2000 pb | 40-100 ng |

- Porter le volume à 20 μ l avec de l'eau distillée

Une fois le mélange terminé, le programme PCR suivant est lancé :

- 5 minutes à 96°C
- 25 cycles :
 - 30 secondes à 96°C
 - 15 secondes à la température d'hybridation des amorces
 - 4 minutes à 60°C
- La réaction est stoppée à 4°C

Une migration des produits d'amplification au niveau d'un gel d'acrylamide 4% est finalement réalisée et les résultats visualisés à l'aide de l'appareil ABI.PRISM. Toutes les PCR sont réalisées en double.

5. Fixation des ADN trappeurs

5.1. Principe

L'objectif est de pouvoir immobiliser les ADN trappeurs au niveau d'un support, préalablement fonctionnalisé. Le dépôt se fait mécaniquement à l'aide d'une aiguille adaptée.

Une liaison covalente imine va alors s'établir entre la fonction amine située à l'extrémité 5' de l'ADN trappeur et la fonction carbonyle de l'aldéhyde présente sur le support. (fig. III.4).

5.2. Matériel

- Robot (Wow, Belgique)
- Aiguilles de 125 µm de diamètre (Genetix, Angleterre)
- Lames de verres Diaglass (EAT, Belgique)
- ADN trappeurs (Eurogentec, Belgique)
- H₂O distillée
- SDS 10% (ICN Biomedicals, USA)
- Borohydrure de sodium (NaBH₄) AF granules (Aldrich chemical, USA)
- PBS frais de composition
 - K₂HPO₄/KH₂PO₄ 10 mM pH7.4 (Merck, Allemagne)
 - NaCl 0,9% (Merck, Allemagne)
- Ethanol 95% (Carlo Erba reagenti, Italie)
- Portoir métallique pour lame de microscope (Merck, Allemagne)
- Microplaque 384 puits (Nunc International, USA)
- Solution de spotting 1 du kit Diaglass (EAT, Belgique)
- Solution de spotting 2 du kit Diaglass (EAT, Belgique)

5.3. Méthode

La fixation des ADN trappeurs se réalisent en trois étapes : la préparation de la plaque, la fixation proprement dite et le lavage des lames.

5.3.1. Préparation de la plaque

La préparation des diverses solutions d'ADN trappeur ainsi que celle des différents contrôles est réalisé suivant le protocole décrit dans le kit DIAGLASS (EAT, Belgique). Une fois les mélanges terminés, les échantillons sont transférés au niveau d'une plaque de 384 puits.

5.3.2. Fixation proprement dite

Cette deuxième étape se réalise en chambre blanche, une pièce stérile qui évite ainsi toute contamination extérieure. Comme dit précédemment, la fixation des ADN trappeurs se fait à l'aide d'un robot équipé d'une aiguille qui va déposer les différentes solutions d'ADN sur un endroit précis de la lame. Ce design sera préalablement programmer au niveau du robot.

La fixation terminée, une incubation des lames d'au moins 1 heure à température ambiante mettra fin à la procédure.

5.3.3. Lavage des lames

Afin de stabiliser les liaisons entre les ADN trappeurs et les lames fonctionnalisées et d'éliminer les liens non-covalents, une série de lavage doit être réalisée. D'un point de vue pratique, les lames, disposées sur un support métallique, sont immergées dans un récipient adapté. Notons que chaque lame est préalablement annotée avant d'être disposée au niveau du portoir.

Le premier lavage est réalisé au niveau d'une solution de SDS 0.2% pendant 2 minutes. Cette première étape a pour but de décrocher les molécules d'ADN non fixées. Après passage dans l'eau distillée 2 X 2 minutes, les lames sont ensuite plongées dans une solution contenant 75% de PBS, 2.5 mg/ml de NaBH₄ et 25% d'éthanol 95% et cela, pendant 5 minutes. Cette réaction inactive les fonctions aldéhydes n'ayant pas réagi avec les ADN trappeurs en les réduisant en fonction alcools et transforme les liens imines formés entre ces derniers et le support en amine plus stable. L'étape de lavage se termine par un bain de deux minutes dans de l'eau distillée, suivi d'un second d'une durée de 3 minutes dans de l'eau distillée bouillante. Ce dernier est destiné à éliminer toutes liaisons non-covalentes subsistantes. Les lames sont ensuite séchées et stockées à 4°C jusqu'à utilisation.

6. Hybridation de l'ADN sur biochips et mise en évidence par une coloration à l'argent

6.1. Principe

Les principes de l'hybridation et de la coloration à l'argent ont été explicités respectivement au niveau des points 3.3.1 et 3.4.3 de l'introduction.

6.2. Matériel

- Lames de verres préalablement spottées (deux damiers par lame)
- ADN cible produit par PCR
- Chambre d'hybridation 65µl (Eppendorf, Allemagne)
- Four d'hybridation : hybridiser HB-1D (Techne Duxford, Royaume-Unis)
- Contrôle positif d'hybridation à une concentration de 225 nM (Eurogentec, Belgique)
- Solution de Denhardt (Eppendorf, Allemagne)
- Solution de NaOH 10N
 - Hydroxyde de sodium (Merck, Allemagne)
 - Eau distillée
- Genomic hybriBuffer (eppendorf, Allemagne)
- Solution de lavage (unibuffer) (EAT, Belgique)
- Solution de rinçage (diabuffer) (EAT, Belgique))
- Boîte de pétri (Stardtest, Allemagne)
- Tween 20 (SIGMA, USA)
- H₂O distillée
- Porte-lame (EAT, Belgique)
- Agent bloquant : gloria en poudre
- Conjugué antibiotine-or (Biocell, UK))
- Solution A du kit silver blue (EAT, Belgique)
- Solution B du kit silver blue (EAT, Belgique)
- Scanner colorimétrique Silverquant 6000 (eppendorf, Allemagne)
- Centrifugeuse centra CL3R (Thermo IEC, USA)

6.3. Méthode

Afin de simplifier les choses, cette procédure va être divisée en quatre étapes : l'hybridation du produit PCR, le lavage des lames, la révélation à l'argent et la numérisation et quantification des damiers.

6.3.1. Hybridation du produit PCR

La préparation de la solution d'hybridation est réalisée sous hôte, afin d'éviter toute contamination au niveau des produits PCR. Elle est constituée des éléments suivants :

- 5 µl de contrôle positif à une concentration de 50 nM
- 5 µl d'une solution de Denhart 100X et cela, afin de diminuer les bruits de fond
- 15 µl de produits PCR

Cette solution est ensuite dénaturée au moyen de 10µl de NaOH 0,175 N. Une brève centrifugation est nécessaire. Après 5 minutes d'incubation, cette réaction est neutralisée à l'aide de 35 µl d'hybribuffer. Le produit, à raison de 65µl, est dès lors prêt à être déposé au niveau du damier, préalablement entouré d'une chambre d'hybridation. Cette dernière va retenir le liquide à l'endroit désiré. Une lamelle couvre objet, délicatement déposée sur la chambre, recouvre le tout. Les lames, disposées dans des boîtes de Pétri, peuvent dès lors être incubées dans un four préalablement préchauffé à 65°C. Le temps d'incubation est de 2 heures.

6.3.2. Lavages des lames

Durant l'incubation, les solutions de lavages ainsi que les différents tampons peuvent être préparées. On compte :

- Le tampon de lavage 1 ou WB1 : solution d'unibuffer diluée 40 fois à laquelle on ajoute 0,1% de tween.
- Le tampon de lavage 2 ou WB2 : solution d'unibuffer diluée 200 fois
- Le tampon de rinçage : solution de diabuffer diluée 4 fois
- Le tampon bloquant : solution d'unibuffer diluée 4 fois à laquelle on ajoute 1 % de gloria
- Le tampon conjugué (au niveau duquel l'anticorps antibiotine sera ajouté) : solution d'unibuffer diluée 4 fois auquel on ajoute 0.1% de gloria.

Au bout de deux heures, les lames peuvent être retirées du four une à une et les chambres d'hybridation ôtées à l'aide d'une pince. Les lames sont alors immédiatement insérées au niveau du porte-lame préalablement rempli de WB1. Trois lavages d'1 minute sont ensuite réalisés à l'aide de cette solution, suivi de deux lavages d'1 minute à l'aide du WB2. Les lavages terminés, les lames sont ensuite incubées 10 min dans du tampon bloquant.

6.3.3. Coloration à l'argent

Pendant ce temps, l'anticorps antibiotine couplé à 1 molécule d'or est dilué 500 fois dans du tampon conjugué. Une incubation de 45 minutes, sous agitation, dans cette solution suit celle du tampon bloquant. Ce temps écoulé, les lames sont à nouveau lavées 4X pendant 1 minute dans le WB1. Deux lavages de 30 secondes dans le tampon de rinçage suivront. La

solution d'argent peut désormais être préparée. 10 ml de solution A sont prélevés et ajoutés au niveau de la solution B. Le mélange est ensuite secoué pendant 10 secondes et transvasés au niveau du porte-lame. Ce dernier doit être fermé et, si possible, agité lors de l'incubation. Cinq minutes après le mélange des solutions A et B, l'incubation est interrompue et les lames rincées à l'aide de 2 lavages de 30 secondes à l'eau distillée. Après séchage par centrifugation à l'aide d'un adaptateur, les lames sont prêtes à être scannées.

6.3.4. Numérisation et quantification des damiers

Cette étape de numérisation, réalisée à l'aide du scanner Silverquant 6000 et du logiciel Silverquant Scan, va permettre le traitement informatique des microdamiers colorés à l'argent.

La quantification des signaux d'hybridation se fait, quant à elle, à l'aide du programme Silverquant analysis. Cette procédure va attribuer à chaque spot une valeur correspondant à la moyenne de l'intensité de l'ensemble des pixels le constituant. Le même calcul sera effectué pour le bruit de fond entourant chaque spot afin de pouvoir soustraire cette valeur de l'intensité correspondant à ce dernier.

IV. Résultats et discussion

1. Amplification par PCR et séquençage du gène de la gyrase

Comme énoncé dans les objectifs, l'élaboration d'une biochips peut se résumer en cinq étapes:

- La détermination d'un marqueur moléculaire présent au niveau de toutes les espèces et permettant leur amplification commune
- La sélection des amorces consensus
- La mise au point de la PCR suivie de l'amplification et du séquençage, chez l'ensemble des espèces, du fragment de gène marqueur délimité par les amorces
- La recherche de sondes captrices spécifiques à chaque espèce au niveau du fragment séquencé
- La détection des ADN cibles par hybridation sur biochips

Les deux premières étapes ainsi que la mise au point de la PCR ayant été réalisées ultérieurement, l'objectif de cette première partie consistera à amplifier le gène marqueur au niveau des 20 espèces bactériennes correspondant aux agents pathogènes des voies respiratoires les plus répandus en milieu hospitalier (tableau IV.1).

Néanmoins, afin d'introduire ce chapitre, les premières étapes vont être brièvement explicitées.

1.1. Détermination du gène marqueur

Le marqueur sélectionné pour ce projet est la sous-unité A du gène de la gyrase. Cette enzyme constituée de deux sous-unités A et B est capable d'induire un changement de conformation de l'ADN en catalysant, à l'aide d'ATP, un superenroulement négatif (fig. IV.1). Ceci va favoriser la formation d'un œil de réplication en relâchant la tension provoquée par le superenroulement positif. Cet enzyme peut également, sans consommation d'ATP, provoquer le relâchement d'ADN superenroulé négativement (Drlica and Zhao, 1997). Ces différentes fonctions vont donc lui conférer un rôle primordial dans la transcription et la division cellulaire ce qui explique sa présence et surtout son pourcentage d'homologie important chez les différentes espèces bactériennes. Il présente néanmoins une hétérogénéité suffisante pour sélectionner des séquences spécifiques à chaque espèce

1.2. Sélection des amorces

Le gène de la gyrase est un marqueur déterminé pour détecter les espèces proches phylogénétiquement. Certaines étant fort éloignées les unes des autres, son amplification au niveau de toutes les espèces à l'aide d'une seule paire d'amorces semblait assez compromise.

Suite à un travail d'alignement des séquences connues de la sous-unité A de la gyrase, plusieurs couples d'amorces furent donc sélectionnés au niveau des régions les plus conservées. Le pourcentage d'homologie entre les GRAM + et les GRAM – étant trop faible, des amorces consensus spécifiques à ces deux groupes ont été choisies.

Au niveau des GRAM -, 1 amorce sens et 3 amorces antisens purent être mises en évidence (fig. IV.2a).

- **Le couple gyr1/gyr2:** situé dans une des régions les plus conservées du gène, ce couple d'amorces devrait amplifier un fragment de 200 paires de bases. Néanmoins, sa petite taille associée à un haut pourcentage d'homologie entre les différentes bactéries rend difficile le choix d'une séquence trappeur spécifique à chaque espèce.
- **Le couple gyr1/gyr5:** situé dans une région moins conservée que le couple précédent, il permet d'amplifier un fragment d'environ 1kb ce qui va faciliter grandement le choix de trappeur spécifique.
- **Le couple gyr1/gyr4:** amplifiant également une région de plus ou moins 1 kb, il va aussi favoriser la recherche de sondes spécifiques. Cependant, il est situé dans une région beaucoup moins conservée que les deux précédents ce qui risque de diminuer l'efficacité de la PCR.

Au niveau des GRAM +, seul un couple d'amorces fut nécessaire pour amplifier les 5 espèces. Il est constitué de l'amorce gyr 1, situé dans une région hautement conservée et retrouvée précédemment chez les GRAM – et de l'amorce gyr 3, positionnée dans une région conservée uniquement chez les GRAM +. Le fragment amplifié devrait comporter 350 paires de base (fig IV.2.b)

L'utilisation de ces 4 couples d'amorces devrait permettre l'amplification d'une partie de la séquence du gène marqueur chez un maximum d'espèces.

Notons que, bien que sélectionnés dans les régions les plus conservées, l'introduction de bases dégénérées au niveau de chaque oligonucleotide s'est avérée nécessaire.

La sélection de séquences trappeurs les plus spécifiques possibles est le critère prédominant dans le choix des couples d'amorces associées au GRAM-. La paire gyr1/gyr5, présentant une taille de 1kb et située dans une région plus conservée que gyr1/gyr4 sera donc privilégiée dans un premier temps. En cas d'absence d'amplification chez certaines espèces, le deuxième couple amplifiant un fragment de 1 kb c'est-à-dire gyr1/gyr 4 sera ensuite testé.

Gyr1/gyr2 ne sera expérimenté que s'il subsiste encore des espèces n'ayant pu être amplifiées.

1.3. Mise au point de la PCR

Cette étape d'optimisation de la PCR a déjà été réalisée ultérieurement sur l'ADN génomique de 3 espèces. Les conditions utilisées sont celles répertoriées au paragraphe 1.3 de matériel et méthode.

Notons à ce niveau quelques particularités comme par exemple l'utilisation de l'ultratools, une enzyme faisant partie de la famille des Tth polymérases. En effet, les amorces étant dégénérées, l'utilisation d'une polymérase moins spécifique s'est avérée nécessaire pour optimiser l'amplification des fragments. Un fort rapport $MgCl_2$ / tampon favorise également l'appariement de ce type d'amorces.

La température d'hybridation, quant à elle, fut déterminée afin de privilégier l'appariement des oligonucleotides au niveau de toutes les espèces.

1.4. Amplification du marqueur gyrase

Suivant les conditions établies et répertoriées au point III.1.3, l'amplification de l'ADN cible au niveau des 20 espèces bactériennes et cela, à l'aide des différents couples d'amorces isolés, va pouvoir être réalisée.

1.4.1. Amplification de l'ADN cible au niveau des 5 espèces de GRAM + à l'aide du couple d'amorces gyr 1 /gyr 3

1.4.1.1. Conditions expérimentales

La PCR est réalisée suivant les conditions reprises au point III.1.3 sur l'ADN génomique de référence des 5 espèces de GRAM+: *S.aureus*, *S. pneumoniae*, *S.oralis*, *E. faecium* et *E. faecalis*. Les amorces utilisées sont le couple gyr1/gyr3.

1.4.1.2. Résultats et conclusions

Comme nous pouvons le constater dans la figure IV.3, l'amplification d'un fragment correspondant à la taille attendue de 350 paires de base peut être observée au niveau des cinq espèces de GRAM +. Aucune bande aspécifique visible n'est présente.

1.4.2. Amplification du gène de la gyrase chez les 15 espèces de GRAM - à l'aide du couple d'amorces gyr 1 /gyr 5

1.4.2.1. Conditions expérimentales

La PCR est réalisée suivant les conditions reprises au point III.1.3. Chaque PCR sera réalisée en double. Les amorces utilisées sont le couple gyr1/gyr5.

Les différentes espèces testées, au nombre de 15, sont *E.coli*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *S.marcescens*, *K.pneumoniae*, *P.aeruginosa*, *P.stuartii*, *C.freundii*, *P.mirabilis*, *P. vulgaris*, *S.maltophilia*, *A. calcoaceticus*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis* et *L.pneumophila*.

1.4.2.2. Résultats et conclusions

La figure IV.4 permet de constater l'amplification de la séquence d'intérêt de 1kb au niveau de 7 espèces : *E.coli*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *S.marcescens*, *K.pneumoniae*, *C.freundii*, *P. Stuartii*. Les différentes bandes amplifiées sont d'une intensité variable selon les espèces. Quelques bandes aspécifiques sont également observées dans la plupart des cas. Leur présence peut s'expliquer par le choix d'une température d'hybridation assez basse,

permettant l'appariement des amorces au niveau de toutes les espèces. Le désavantage est le manque de spécificité qui en résulte.

Cela ne devrait néanmoins pas porter à conséquence, la détection par biochips se faisant à l'aide de séquences trappeurs spécifiques de la séquence d'intérêt.

Au niveau de *P. aeruginosa*, le fragment amplifié, beaucoup plus faible en intensité que les précédents, semble être légèrement plus petit que 1kb. Un autre couple d'amorces va donc être testé afin de tenter d'amplifier un fragment plus approprié.

Beaucoup de bandes aspécifiques sont à nouveau présentes.

Au niveau des 7 espèces restantes, *P.mirabilis*, *P.vulgaris*, *A.calcoaceticus*, *S.maltophilia*, *H.influenzae*, *M.catarrhalis* et *L.pneumophila*, aucun fragment correspondant à la taille voulue n'a pu être isolé (résultats non montrés).

1.4.3. Amplification de l'ADN cible au niveau des 8 de GRAM - restantes à l'aide du couple d'amorces gyr 1 /gyr 4

1.4.3.1. Conditions expérimentales

Les conditions PCR sont identiques à celle répertoriées au point III.1.3. Les PCR sont réalisées en double et les amorces utilisées sont le couple gyr1/gyr4.

L'amplification du gène marqueur à l'aide du couple d'amorces gyr 1/ gyr 4 est testée au niveau de *P. vulgaris*, *P.mirabilis*, *A.calcoaceticus*, *S.maltophilia*, *H.influenzae*, *M. catarrhalis*, *L.pneumophila* et *P.aeruginosa*.

1.4.3.2. Résultats et conclusions

Le profil électrophorétique de la figure IV.5 montre une amplification du fragment correspondant à la taille théorique attendue de 1 kb chez 3 espèces sur les 8 testées : *P.vulgaris*, *P.mirabilis* et *A. calcoaceticus*. L'intensité des différentes bandes amplifiées est assez faible par rapport à celle obtenues chez les espèces amplifiées par gyr1/gyr5.

Au niveau des aspécificités, une bande parasite d'une intensité plus importante que celle d'intérêt est observée chez *P. mirabilis*. *A.calcoaceticus* présente également des séquences amplifiées aspécifiques.

Quatre espèces, *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *L.pneumophila* et *P.aeruginosa*, n'amplifient aucun fragment.

Dans le cas de *S. maltophilia*, un des fragments amplifiés semble avoir une taille située entre 700 et 800 paires de base. Il semble donc peu probable qu'il s'agisse d'un fragment du gène de la gyrase, la différence de taille avec le fragment théoriquement attendu étant assez importante. Ce dernier point sera vérifié lors du séquençage. L'intensité de la bande amplifiée est de nouveau plus faible que celle obtenue avec le couple gyr 1/gyr 5. Un troisième test avec le dernier couple d'amorces sera donc réalisé afin de tenter d'isoler une séquence plus appropriée et mieux amplifiée.

1.4.4. Amplification de l'ADN cible au niveau des 5 dernières espèces à l'aide du couple d'amorces gyr1 /gyr 2

1.4.4.1. Conditions expérimentales

Des doubles PCR sont à nouveau réalisées suivant les conditions reprises au point III.1.3. Les amorces utilisées sont le couple gyr1/gyr2.

Les espèces testées sont *H.influenzae*, *M.catarrhalis*, *L.pneumophila*, *S.maltophilia* et *P.aeruginosa*.

1.4.4.2. Résultats et conclusions

Comme nous le montre la figure I.V.6, une amplification de la séquence d'intérêt de 200 pb peut être observée au niveau de *H.influenzae*, *M.catarrhalis* et *L.pneumophila*. L'intensité de la bande est moins intense chez cette dernière. Aucune bande aspécifique n'est présente chez ces trois espèces.

Au niveau de *S.maltophilia* et *P.aeruginosa*, aucune amplification du fragment correspondant à la taille attendue n'a pu être visualisée.

1.4.5. Conclusion générale

En conclusion, l'amplification par réaction PCR effectuée sur les 20 espèces à détecter en utilisant 4 couples d'amorces a permis d'obtenir 1 ADN cible de taille attendue pour l'ensemble des espèces (tableau IV.2).

Au niveau des GRAM +, le couple gyr1/gyr 3 a permis d'amplifier le fragment de taille attendue de 350 pb chez les 5 espèces présentes: *S.aureus*, *S. pneumoniae*, *S.oralis*, *E. faecium* et *E. faecalis*.

Chez les GRAM -, 3 couples d'amorces furent utilisés pour amplifier le gène marqueur chez l'ensemble des 15 espèces.

Le couple d'amorces gyr 1/gyr 5 a permis d'amplifier le fragment de taille attendue de 1 kb chez 7 espèces sur les 15 testées: *E.coli*, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *S.marcescens*, *K.pneumoniae*, *C.freundii*, *P. Stuartii*.

P. aeruginosa, également amplifié par cette paire d'oligonucléotide, présente, quant à lui, un fragment de taille légèrement plus petite.

Les 7 espèces restantes ne montrèrent aucune amplification.

Un deuxième couple d'amorce, gyr1/gyr4, fut donc testé à leur niveau. 3 espèces, *P.vulgaris*, *P.mirabilis* et *A.calcoaceticus*, présentèrent une amplification correspondante au fragment de taille attendue de 1 kb.

Seul une bande située entre 700 et 800 paires de base put être observée pour *S.maltophilia*. Néanmoins, aucun autre fragment n'ayant pu être amplifiés à l'aide de l'un des autres couples, ce dernier sera conservé pour la sélection des sondes trappeurs. Il en sera de même pour le fragment de 1 kb amplifié par les amorces gyr 1/gyr 5 de *P.aeruginosa*.

Les trois dernières espèces restantes, *H.influenzae*, *M.catarrhalis* et *L.pneumophila*, furent amplifiées par le dernier couple d'amorce, gyr1/gyr2.

Le tableau reprenant le nombre de substitutions entre les amorces et les différentes séquences théoriques connues confirme les résultats obtenus (tableau IV.3). Un nombre de substitutions de maximum 3 est admis pour qu'une amplification soit possible. Comme on peut le constater, excepté pour le cas de *P.aeruginosa*, les résultats théoriques confirment bien les amplifications obtenues.

Suite à leur amplification, les séquences de ces 20 fragments vont être analysées par séquençage.

1.5. Séquençage des différents fragments

Les séquences théoriques de la sous-unité A de la gyrase ne sont connues que pour quelques espèces à identifier sur la chips. Il est donc nécessaire de réaliser un travail de séquençage important afin de choisir des sondes captrices les plus spécifiques possible.

Le séquençage des fragments amplifiés comportera donc deux objectifs. Il va permettre, d'une part de vérifier la séquence amplifiée de certaines espèces en la comparant avec la séquence théorique, d'autre part, d'établir cette séquence chez les espèces dont la séquence théorique est inconnue.

1.5.1. Conditions expérimentales

Avant l'étape de séquençage proprement dite, le fragment PCR obtenu doit être préalablement purifiés sur gel d'agarose et cela, afin d'empêcher toute interférence de la séquence avec une bande parasite. La méthode employée est explicitée au point III.1.3. Le produit obtenu, mélangé aux amorces ayant permis son amplification, sera ensuite séquencé suivant la procédure décrite au point III.4. Les séquences seront ensuite analysées comme explicitée au point III.5.

Notons que chaque produit PCR sera séquencé deux fois. On aura donc deux échantillons mélangés à l'amorce sens et deux autres mélangés à l'amorce antisens.

1.5.2. Résultats et conclusions

Les différentes séquences obtenues furent analysées selon deux stratégies.

Au niveau d'espèces pour qui la séquence du gène marqueur est connue, le fragment reconstitué est comparé à la séquence théorique afin de confirmer qu'il s'agit bien de la séquence de la gyrase. Ce travail d'alignement sera effectué pour 6 espèces de GRAM -, *K.pneumoniae*, *E.coli*, *S.marcescens*, *H.influenzae*, *P.aeruginosa* et *P.mirabilis* et 4 espèces de GRAM +, *E.faecalis*, *E.faecium*, *S.aureus* et *S.pneumoniae*.

Comme on peut le constater dans le cas de *S. marcescens* illustré à la figure IV.7 on observe une très bonne correspondance entre les séquences des deux PCR et cela, dans le cas des amorces sens et antisens. De même la séquence théorique offre une forte similitude avec notre fragment amplifié. On peut donc en conclure qu'il s'agit bien d'un fragment du gène de la gyrase.

Au niveau de *P.aeruginosa*, les séquences obtenues ne furent malheureusement pas traitables, et cela bien que le séquençage ait été réalisé plusieurs fois.

Un même travail d'alignement fut effectué pour les autres espèces. Toutes les séquences purent être confirmées.

Dans le cas d'espèces pour qui la séquence du gène marqueur est inconnue, la comparaison sera effectuée avec le fragment théorique appartenant à une espèce proche. On retrouve ce cas de figure au niveau de 9 espèces de GRAM-, *E.aerogenes*, *E.cloacae*, *C.freundii*, *P.stuartii*, *S.maltophilia*, *P.vulgaris*, *A.calcoaceticus*, *M.catarrhalis* et *L.pneumophila* et d'une seule espèce de GRAM+, *S.oralis*.

La figure IV.8 montre l'alignement réalisé entre deux séquences de *C.freundii* obtenues à l'aide de l'amorce gyr5 et la séquence théorique d'*E.coli*.

On peut observer :

- Une parfaite similitude entre les séquences obtenues pour les 2 PCR
- Une bonne homologie entre les séquences de *C.freundii* et de *E.coli*.

On peut donc en conclure qu'il s'agit très probablement d'un fragment du gène de la gyrase.

Le même travail de comparaison fut effectué avec les séquences obtenues à l'aide de l'amorce gyr1 ainsi que pour l'ensemble des autres espèces. Toutes les séquences purent être reconstituées.

Au niveau de *S.maltophilia*, par contre, l'alignement des séquences présente un pourcentage d'homologie trop faible avec *E.coli* pour qu'il puisse s'agir du gène marqueur (résultats non montrés).

En conclusion, la séquence cible d'un fragment du gène de la gyrase A a pu être reconstituée au niveau de 18 espèces et pourra, de ce fait, servir de support à la recherche d'une séquence spécifique.

Dans le cas de *S.maltophilia*, la séquence reconstituée ne correspond pas au gène marqueur. Néanmoins, étant donné l'intensité satisfaisante de la bande au niveau de la PCR, une sonde caprice pourra quand même être isolée au niveau de cette séquence.

Comme dit précédemment, au niveau de *P.aeruginosa*, les séquences obtenues pour chacune des amorces étaient trop incomplètes pour permettre de reconstituer l'entière du fragment. Actuellement, aucune sonde caprice ne pourra donc être isolée pour cette espèce. Les alternatives proposées pour permettre néanmoins sa détection dans le futur seront discutées dans le chapitre conclusions et perspectives.

2. Recherche de séquences trappeurs

Le but de cette seconde partie est de sélectionner, au niveau de chaque fragment amplifié, une séquence qui soit spécifique à chaque espèce. Fixée au niveau du support, elle va nous permettre par hybridation avec l'ADN cible d'identifier l'espèce bactérienne présente dans un échantillon clinique.

A cet effet, les différentes séquences obtenues au niveau de chaque espèce ainsi que des séquences du gène de la gyrase provenant d'espèces proches mais non détectées sur la chips vont être alignées afin d'identifier les régions les plus spécifiques à chacune d'entre elle. L'ajout de séquences supplémentaires correspondant à des espèces non concernées par le projet va permettre d'augmenter la spécificité de la recherche.

Une fois ces régions isolées, plusieurs sondes captrices d'une taille de 25 paires de bases vont être sélectionnées pour chaque espèce. Leur nombre étant assez conséquent, une hiérarchisation va être établie au niveau de ces dernières selon différents critères.

- Le nombre de substitutions par rapport à une autre espèce devra être au minimum équivalente à trois paires de bases sur les 25.
- La formation de hairpin ou de duplex devra au maximum être évitée. Ce dernier point pourra être vérifié à l'aide du programme oligo 6.
- La température d'hybridation devra être située entre 74 et 76°C pour toutes les sondes. Au cas où cela serait impossible, la taille de la séquence pourra être modifiée afin d'atteindre la température voulue.
- Les hybridations parasites avec d'autres microorganismes devront également être évitées au maximum. Un blast local permettant un alignement de la séquence trappeur isolée pour les 19 espèces au niveau d'une banque de donnée composée de 70 séquences de la gyrase appartenant à des espèces proches, va donc être réalisé. Une trop forte similitude pourra dès lors être détectée et les hybridations parasites évitées.
- L'absence d'hybridations parasites avec le génome humain devra être confirmée à l'aide d'un blast des différentes séquences trappeurs au niveau de celui-ci.

La prise en compte de ces différents facteurs va permettre d'isoler une séquence trappeur optimale pour chacune des 19 espèces. Leurs principales caractéristiques sont répertoriées au tableau IV.4.

3. Hybridation des ADN cibles

Après sélection et synthèse des différents ADN trappeurs, ces derniers vont être fixés au niveau d'une lame de verre suivant un design particulier (fig. IV.9). Chacune sonde est déposée en triplicat.

Différents contrôles d'hybridation ont été disposés au niveau de la chips.

- **Le contrôle de fixation:** il correspond à une séquence d'ADN préalablement biotinylée disposée selon une courbe de concentration. Son absence témoigne d'un problème soit au niveau de la détection, soit au niveau de la fixation des ADN trappeurs.
- **Le contrôle positif d'hybridation:** ADN cible ajouté au niveau du mélange post-PCR, il va s'hybrider sur une sonde spécifique, disposée en concentration croissante au niveau de la chips. L'absence de signal témoigne d'un problème au niveau de l'hybridation.

- **Le contrôle négatif d'hybridation:** il s'agit d'une sonde ne possédant aucun ADN qui lui est directement complémentaire dans notre échantillon. Il témoigne de la présence ou de l'absence d'hybridations non-spécifiques.

Ce chapitre se subdivise en deux parties. La première se centre sur la mise en évidence de la spécificité des différents ADN trappeurs à partir d'ADN cibles produits par PCR ainsi que sur la mise au point des conditions d'hybridation. La deuxième se concentrera sur les tests de sensibilité de la PCR et de l'hybridation. A ce niveau, seuls deux espèces seront étudiées.

3.1. Hybridations des 19 ADN cibles produits par PCR au niveau de la biochips et mise au point des conditions

3.1.1. Test de spécificité des ADN trappeurs

3.1.1.1. Conditions expérimentales

Les ADN génomiques des différentes espèces sont préalablement amplifiés par PCR et marqués, lors de cette étape, à l'aide de dCTP et de dATP biotinylés. Ce marquage va permettre la détection des hybrides par une coloration à l'argent. Les conditions utilisées sont celles décrites au point III.1.3 sous le terme PCR biotinylée. Chaque ADN est amplifié avec le couple d'amorces qui lui est associé.

Les amplicons biotinylés sont ensuite hybridés à une température de 65°C et quantifiés selon les conditions répertoriées au point III.6.3

3.1.1.2. Résultats et conclusions

Les résultats des PCR biotinylées sont présentés à la figure IV.10. Comme on peut le constater, l'ADN cible est amplifié au niveau de 17 espèces. Les PCR de *P.vulgaris* et *A.calcoaceticus*, par contre, ne présentent aucun fragment correspondant à la taille attendue de 1 kb malgré plusieurs tentatives.

En ce qui concerne les hybridations, les résultats repris à la figure IV.11 montrent que 7 espèces *S. maltophilia*, *S.oralis*, *S.pneumoniae*, *E.faecium*, *E.faecalis*, *S.aureus* et *H.influenzae* présentent une hybridation spécifique sur le trappeur correspondant sans hybridation croisée sur d'autres trappeurs. Comme on peut le constater au niveau des graphiques associés, l'intensité des spots est plus faible chez trois des espèces de GRAM +, *S.aureus*, *S.pneumoniae* et *E.faecalis*. La PCR présentant une amplification importante au niveau de ces espèces, la faible intensité des spots est probablement due aux conditions d'hybridation.

Dans la majorité des autres cas, des hybridations croisées sont retrouvées en plus de la réponse spécifique. Celles-ci sont mentionnées par une flèche au niveau de la figure IV.11. Comme visualisé au niveau du graphique, elles sont en général de faible intensité par rapport à la réponse spécifique et au nombre d'une seule par espèce, excepté au niveau de *E.coli* et de *M.catarrhalis* qui en présentent deux. La réponse spécifique, par contre montre une intensité importante chez la plupart des espèces sauf chez *L. pneumophila* et *P.stuarti*. Dans ce dernier cas, l'intensité du spot est presque similaire à celle du spot de l'hybridation croisée.

Trois espèces n'ont malheureusement donné aucune réponse spécifique. Il s'agit de *C.freundii*, *P.vulgaris* et *A.calcoaceticus*. Au niveau de ces deux dernières espèces, les résultats de l'hybridation étaient assez prévisibles, aucune amplification spécifique n'apparaissant au niveau du gel après PCR. Notons néanmoins la présence d'une hybridation croisée au niveau de *P.vulgaris*.

En conclusion, sur les 17 espèces amplifiées, 7 ont présenté des hybridations spécifiques *S. maltophilia*, *S.oralis*, *S.pneumoniae*, *E.faecium*, *E.faecalis*, *S.aureus* et *H.influenza*. A l'exception de *C. freundii* au niveau duquel aucun signal n'a pu être mis en évidence, des hybridations croisées accompagnent la réponse spécifique chez les 9 autres espèces restantes. Le gel ne présentant pas d'amplification au niveau de *P.vulgaris* et *A.calcoaceticus*, aucune hybridation spécifique n'a pu être observée.

Quantitativement, on note une intensité plus faible au niveau de 3 espèces de GRAM +, *S.aureus*, *E.faecalis*, *S.pneumoniae* et de deux espèces de GRAM-, *L.pneumophila* et *P.stuartii*. L'amplification par PCR présentant des fragments d'intensité importante, les conditions d'hybridation doivent probablement être mises en cause.

Plusieurs hypothèses peuvent être proposées quant à la présence de ces hybridations non spécifiques.

La possibilité d'une hybridation croisée due à un trop faible nombre de substitutions entre les différentes séquences trappeurs peut tout d'abord être éliminée. Celles-ci sont en effet suffisantes dans chacun des cas.

Quatre hypothèses plausibles peuvent dès lors être avancées. Il pourrait soit s'agir d'une contamination lors de la synthèse des ADN trappeurs, soit de l'hybridation d'un des fragments aspécifiques amplifiés lors de la PCR, soit d'une contamination au niveau du spotting ou soit d'une contamination des échantillons d'ADN génomique suite aux trop nombreuses manipulations.

La prochaine étape consistera donc à tenter d'éliminer ces hybridations non spécifiques. Différents paramètres vont donc être testés: d'une part des lavages plus stringents, d'autre part température d'hybridation plus élevée.

3.1.2. Etude de la stringence des lavages post-hybridation

Comme dit dans l'introduction, une plus haute concentration en sels favorise la formation d'hybride en annulant les charges phosphates négatives de l'ADN. La force de répulsion entre les deux brins est donc fortement diminuée ce qui facilite l'appariement.

Une diminution de cette concentration c'est-à-dire une augmentation de la stringence du lavage devrait donc permettre de déstabiliser les hybridations non spécifiques.

3.1.2.1. Conditions expérimentales

Les produits PCR précédemment amplifiés (voir point IV.3.1.1) vont donc être réhybridés au niveau de la biochips en utilisant des lavages plus stringents que ceux décrits précédemment.

| | Lavages normaux | Lavages stringents |
|-----------------------------------|--|--|
| Après hybridation | <ul style="list-style-type: none"> WB1: solution d'unibuffer dilué 40 fois + tween 0,1% (3 x 1 min) WB2: solution d'unibuffer diluée 200 fois (2 x 1 min). | <ul style="list-style-type: none"> L1: solution d'unibuffer diluée 2000 fois (4 X 2 min). / |
| Après incubation avec le conjugué | <ul style="list-style-type: none"> 4 lavages d'1 min avec le WB1 | <ul style="list-style-type: none"> WB1 (3 x 1min) L3: solution d'unibuffer diluée 800 fois (2 x 1 min). |

L'ensemble des autres paramètres impliqués dans l'étape d'hybridation ne subira aucune variation par rapport au protocole explicité au point III.6.3.

Les espèces testées sont celles présentant des hybridations croisées: *E.coli*, *E.aerogenes*, *S.marcescens*, *P.stuarti*, *M.catarrahlis*, *L.pneumophila* et *P.mirabilis*, *E.cloacae* et *K.pneumoniae*.

3.1.2.2. Résultats et conclusions

Comme on peut le constater au niveau de la figure IV.12, les hybridations croisées ont désormais disparu au niveau de 4 espèces: *S.marcescens*, *E.aerogenes*, *E.cloacae* et *E.coli* qui désormais n'en présente plus qu'une seule. Dans le cas des autres espèces, on n'observe aucun changement.

La réponse spécifique ne présente pas d'atténuation visible de son intensité, excepté chez *L.pneumophila*, où elle diminue très fortement et chez *P.stuarti* où elle disparaît complètement. Au niveau de ce dernier, seul la cross-hybridation au niveau de *S.marcescens* est encore présente.

On note une légère atténuation de l'intensité du contrôle positif d'hybridation.

L'analyse quantitative confirme les résultats obtenus. En effet, comme on peut le constater au niveau de la figure IV.13 l'utilisation d'un lavage plus stringent n'a que très peu d'incidence sur l'intensité de la réponse. La forte atténuation visuelle du signal de *L.pneumophila* est principalement due au fait que la réponse de départ était déjà basse.

En conclusion, l'utilisation d'un lavage plus stringent a permis l'élimination de quatre hybridations croisées chez *S.marcescens*, *E.cloacae*, *E.aerogenes* et *E.coli*. Au niveau de ce dernier, une hybridation reste encore présente, bien qu'atténuée. Ceci porte à 10 le nombre d'espèces présentant désormais des hybridations spécifiques au niveau de leur trappeur correspondant.

Une atténuation de la réponse spécifique est visualisée au niveau de *L.pneumophila* et une disparition du signal a pu être observé chez *P.stuarti*.

Aucun changement majeur n'est visible au niveau des autres espèces.

Cinq hybridations croisées étant encore présente, un second paramètre va être testé: une augmentation de la température d'hybridation à 67°C.

3.1.3. Augmentation de la température d'hybridation

Comme vu dans l'introduction, une augmentation de la température améliore la spécificité de l'appariement. En tout état de cause, la formation d'hybridations croisées devrait s'en trouver réduite.

3.1.3.1. Conditions expérimentales

Les produits PCR du point IV.3.1.1 vont donc être réhybridés à une température d'hybridation de 67°C. Les lavages stringents du point précédent seront de nouveau utilisés.

Les espèces testées sont *E.coli*, *P.mirabilis*, *K.pneumoniae*, *M.catarrhalis* et *L.pneumophila*

3.1.3.2. Résultats et conclusions

Les résultats repris à la figure IV.14 indiquent la disparition de trois hybridations croisées à une température de 67°C, une au niveau de *P.mirabilis*, l'autre au niveau de *M.catarrhalis*. et la dernière au niveau de *L.pneumophila*. Celles retrouvées au niveau de *E.coli* et de *K.pneumoniae* restent présentes bien qu'atténuées.

De nouveau, on retrouve une atténuation du contrôle positif. La cause devra en être déterminée ultérieurement.

Comme on peut le constater au niveau de la figure IV.15, chez *E.coli*, *P.mirabilis* et *K.pneumoniae*, l'augmentation de la température d'hybridation ne diminue que très peu l'intensité de la réponse spécifique. Par contre, une forte atténuation est observée au niveau de *L.pneumophila* et de *M.catarrhalis*.

En conclusion, l'utilisation d'une température d'hybridation plus élevée associée à un lavage plus stringent a permis l'élimination de trois hybridations croisées chez *P.mirabilis*, *M.catarrhalis* et *L.pneumophila*. Ceci porte à 13 le nombre d'espèces présentant désormais des hybridations bien spécifiques. Une forte atténuation de la réponse spécifique est cependant visualisée au niveau de *M.catarrhalis* et de *L.pneumophila*.

3.2. Sensibilité de la biochips pour *H.influenzae* et de *S.oralis*

Ce test va nous permettre de déterminer le nombre de copies d'ADN génomique minimum nécessaire à la PCR pour donner un résultat positif en hybridation.

3.2.1. Conditions expérimentales

Les conditions PCR utilisées sont décrites au point III.1.3. Un nombre de copies d'ADN génomique allant de 10^7 à 10^1 est ajoutée dans chaque tube. 5 µl sont déposés au niveau d'un gel d'électrophorèse et 15 µl sont hybridés.

Deux espèces seront testées : *H.influenzae* et *S.oralis*

Les conditions d'hybridation restent identiques à celles décrites au niveau du point III.6.3.

3.2.2. Résultats et conclusions

Les résultats des PCR biotinylées sont repris à la figure IV.16. Comme on peut le constater, au niveau de *H.influenzae*, une détection limite de 10^4 copies d'ADN génomique est observée sur gel. Dans le cas de *S.oralis*, 10^6 copies seulement peuvent être détectées. La PCR semble donc moins sensible dans ce dernier cas.

En ce qui concerne les hybridations, les résultats obtenus pour les deux espèces sont présentés à la figure IV.17.

Au niveau de *H.influenzae*, un signal spécifique est obtenu pour une quantité d'ADN génomique équivalente à 10^2 copies.

Au niveau de *S.oralis*, la dernière réponse spécifique observée correspond à un nombre de copies d'ADN génomique équivalent à 10^3 .

La biochips pour *H.influenzae* et *S.oralis* présente donc une sensibilité permettant de détecter un minimum de copies d'ADN génomique correspondant respectivement à 10^2 et 10^3 .

V. Conclusions et perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVE

L'objectif de ce mémoire consistait à développer une biochips permettant l'identification des principaux germes pathogènes impliqués dans les pneumonies nosocomiales en utilisant un marqueur prédéfini, la sous-unité A du gène de la gyrase.

La première étape consistait à amplifier le gène marqueur chez les 20 espèces bactériennes incriminées.

Au niveau des GRAM +, le couple d'amorces gyr 1/gyr 3 a permis d'amplifier le gène de la gyrase chez l'ensemble des 5 espèces.

En ce qui concerne les GRAM -, 3 paires d'oligonucléotides furent nécessaire à l'amplification de la totalité des 15 espèces : 8 furent amplifiées par le couple gyr1/gyr 5, 4 par le couple gyr1/ gyr 4 et 3 par le couple gyr1/gyr 2.

Les séquences des différents fragments furent ensuite établies ou vérifiées. Seul celle de *P.aeruginosa* n'a pu être déterminée. Une amplification du gène marqueur à l'aide d'oligonucléotides spécifiques à *P. aeruginosa* permettrait peut-être d'obtenir une séquence sur laquelle on puisse se baser.

Actuellement, l'amplification de l'ensemble des 20 espèces nécessite 4 PCR, une pour chaque couple d'amorces. Une des prochaines étapes sera de mettre au point la PCR multiplex. Celle-ci devrait permettre l'amplification du gène marqueur au niveau de toutes les espèces en une PCR unique.

La sélection de sondes de capture permettant l'identification spécifique des différentes espèces constituait la deuxième étape. Elle fut réalisée pour les 19 espèces dont la séquence fut établie.

La troisième partie consistait d'une part à tester la spécificité de la chips développée et à mettre au point leur condition d'hybridation, d'autre part à tester la sensibilité de la biochips.

Suite à la mise au point des conditions d'hybridations, une réponse spécifique a pu être obtenue au niveau de 13 espèces sur les 19. En ce qui concerne les 6 autres, différents problèmes se sont posés.

Au niveau de *A.calcoaceticus* et de *P.vulgaris*, aucun fragment correspondant à la taille de 1kb ne pu être réamplifié et cela, bien que plusieurs PCR furent réalisées. Soit de nouvelles conditions PCR permettant l'amplification de ces deux espèces devront être mises au point, soit de nouvelles sondes de capture devront être isolées au niveau d'une région que l'on puisse amplifier.

En ce qui concerne *C.freundii*, aucune réponse spécifique n'a pu être visualisée et cela, bien que la PCR présente une belle amplification. Il est possible qu'une structure secondaire se forme lors de l'hybridation. Une nouvelle sonde de capture devra donc être recommandée.

Les 3 dernières espèces *E.coli*, *K.pneumoniae* et *P.stuartii*, présentaient des hybridations croisées que ni le lavages, ni une température d'hybridation plus élevée n'ont pu éliminer. Le nombre de substitutions entre espèces étant suffisamment élevé, cette hypothèse ne peut expliquer ces hybridations croisées. Une contamination lors de la fixation des sondes captrices ou au niveau des échantillons d'ADN génomique n'est pas non plus à mettre en

cause, ces hypothèses ayant été vérifiées. Plusieurs suppositions peuvent donc être avancées quant à leur présence.

La première hypothèse concernerait une éventuelle contamination lors de la synthèse des ADN trappeurs. Une hybridation réalisée à l'aide d'un nouveau lot de sondes captrices devra être effectuée afin d'écarter ses présomptions.

Une hybridation d'un des fragments aspécifiques amplifiés lors de la PCR constituerait une deuxième hypothèse. Afin de l'éliminer, une PCR biotinylée réalisée sur des fragments PCR purifiés pourrait être hybridée au niveau de la chips. Si les hybridations croisées disparaissent, notre présomption sera confirmée. Dans ce cas de figure, les conditions PCR devront être remises au point afin d'éliminer les différentes bandes aspécifiques.

Dans le cas où la source de contamination ne pourrait être mise en évidence, un nouveau marqueur devra être déterminé pour permettre d'identifier les espèces manquantes.

La sensibilité de la biochips fut évaluée au niveau de deux espèces, *H.influenzae* et *S.oralis*. Les résultats obtenus mettent en évidence une limite de détection correspondant respectivement à 10^2 et 10^3 copies d'ADN génomique. Cette procédure devra s'étendre aux autres espèces.

La spécificité devra finalement être confirmée en hybridant au niveau de la biochips l'ADN génomique d'espèces proches. La validation par des tests cliniques constituera la dernière étape.

VI. Bibliographie

- Alexandre, I., Hamels, S., Dufour, S., Collet, J., Zammattéo, N., De Longueville, F., Gala, J.L. and Remacle, J. (2001) Colorimetric silver detection of DNA microarrays. *Anal Biochem*, **295**, 1-8.
- Alexandre, I., Houbion, Y., Collet, J., Hamels, S., Demarteau, J., Gala, J.L. and Remacle, J. (2002) Compact disc with both numeric and genomic information as DNA microarray platform. *Biotechniques*, **33**, 435-436, 438-439.
- Allemand, J.F., Bensimon, D., Jullien, L., Bensimon, A. and Croquette, V. (1997) pH-dependent specific binding and combing of DNA. *Biophys J*, **73**, 2064-2070.
- Call, D.R., Brockman, F.J. and Chandler, D.P. (2001) Detecting and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplexed PCR and nucleic acid microarrays. *Int J Food Microbiol*, **67**, 71-80.
- Chen, J.J., Wu, R., Yang, P.C., Huang, J.Y., Sher, Y.P., Han, M.H., Kao, W.C., Lee, P.J., Chiu, T.F., Chang, F., Chu, Y.W., Wu, C.W. and Peck, K. (1998) Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics*, **51**, 313-324.
- Cloud, J.L., Carroll, K.C., Pixton, P., Erali, M. and Hillyard, D.R. (2000) Detection of *Legionella* species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation. *J Clin Microbiol*, **38**, 1709-1712.
- Cotran, R., Kumar, V., Collins, T. and Robbins, S. (1999) *Robbins Pathologic Basis of Disease*. W B Saunders company, Philadelphia.
- de Longueville, F., Surry, D., Meneses-Lorente, G., Bertholet, V., Talbot, V., Evrard, S., Chandelier, N., Pike, A., Worboys, P., Rasson, J.P., Le Bourdelles, B. and Remacle, J. (2002) Gene expression profiling of drug metabolism and toxicology markers using a low-density DNA microarray. *Biochem Pharmacol*, **64**, 137-149.
- Drlica, K. and Zhao, X. (1997) DNA gyrase, topoisomerase IV, and the 4-quinolones. *Microbiol Mol Biol Rev*, **61**, 377-392.
- Ducel, G., Fabry, G. and Nicolle, L. (2002) Prevention of Hospital-acquired infections. A practical guide. World Health Organisation, p. 64.
- Duggan, D.J., Bittner, M., Chen, Y., Meltzer, P. and Trent, J.M. (1999) Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*, **21**, 10-14.
- Favis, R., Day, J.P., Gerry, N.P., Phelan, C., Narod, S. and Barany, F. (2000) Universal DNA array detection of small insertions and deletions in BRCA1 and BRCA2. *Nat Biotechnol*, **18**, 561-564.
- Fields, B.S., Benson, R.F. and Besser, R.E. (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev*, **15**, 506-526.
- Fukushima, M., Kakinuma, K., Hayashi, H., Nagai, H., Ito, K. and Kawaguchi, R. (2003) Detection and identification of *Mycobacterium* species isolates by DNA microarray. *J Clin Microbiol*, **41**, 2605-2615.
- Garrouste-Orgeas, M., Chevret, S., Arlet, G., Marie, O., Rouveau, M., Popoff, N. and Schlemmer, B. (1997) Oropharyngeal or gastric colonization and nosocomial pneumonia in adult intensive care unit patients. A prospective study based on genomic DNA analysis. *Am J Respir Crit Care Med*, **156**, 1647-1655.
- Ghosh, S.S. and Musso, G.F. (1987) Covalent attachment of oligonucleotides to solid supports. *Nucleic Acids Res*, **15**, 5353-5372.
- Greiner, O., Day, P.J., Altwegg, M. and Nadal, D. (2003) Quantitative detection of *Moraxella catarrhalis* in nasopharyngeal secretions by real-time PCR. *J Clin Microbiol*, **41**, 1386-1390.
- Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R. and Smith, L.M. (1994) Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res*, **22**, 5456-5465.

- Hamels, S., Gala, J.L., Dufour, S., Vannuffel, P., Zammattéo, N. and Remacle, J. (2001) Consensus PCR and microarray for diagnosis of the genus *Staphylococcus*, species, and methicillin resistance. *Biotechniques*, **31**, 1364-1366, 1368, 1370-1362.
- Hayden, R.T., Uhl, J.R., Qian, X., Hopkins, M.K., Aubry, M.C., Limper, A.H., Lloyd, R.V. and Cockerill, F.R. (2001) Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture. *J Clin Microbiol*, **39**, 2618-2626.
- Higgins, T. (1999) Nosocomial Pneumonia: Intensive Care Unit Perspective. *Current Treatment Options in Infectious Diseases*, **1**, 159-175.
- Johanson, W. and Dever, L. (2003) Nosocomial pneumonia. *Intensive care med*, **29**, 23-29.
- Jourdain, B., Novara, A., Joly-Guillou, M.L., Dombret, M.C., Calvat, S., Trouillet, J.L., Gibert, C. and Chastre, J. (1995) Role of quantitative cultures of endotracheal aspirates in the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, **152**, 241-246.
- Kirtland, S.H., Corley, D.E., Winterbauer, R.H., Springmeyer, S.C., Casey, K.R., Hampson, N.B. and Dreis, D.F. (1997) The diagnosis of ventilator-associated pneumonia: a comparison of histologic, microbiologic, and clinical criteria. *Chest*, **112**, 445-457.
- Kohn, S.e.a. (2004) Causative microorganisms of hospital-acquired pneumonia and laboratory procedures for isolation and identification of causative microorganisms. The committee for the Japanese Respiratory Society guidelines in management of respiratory infections. *Respirology*, **9**, S6-S12.
- Lamture, J.B., Beattie, K.L., Burke, B.E., Eggers, M.D., Ehrlich, D.J., Fowler, R., Hollis, M.A., Kosicki, B.B., Reich, R.K., Smith, S.R. and et al. (1994) Direct detection of nucleic acid hybridization on the surface of a charge coupled device. *Nucleic Acids Res*, **22**, 2121-2125.
- Lipshutz, R.J., Fodor, S.P., Gingeras, T.R. and Lockhart, D.J. (1999) High density synthetic oligonucleotide arrays. *Nat Genet*, **21**, 20-24.
- Mandell, L.A. and Campbell, G.D., Jr. (1998) Nosocomial pneumonia guidelines: an international perspective. *Chest*, **113**, 188S-193S.
- Marmur, J. (1994) DNA strand separation, renaturation and hybridization. *Trends Biochem Sci*, **19**, 343-346.
- Matson, R. and Rampal, J. (2003) DNA Arrays: Past, Present, and Future. *Genomic Proteomic Technology*, **april/may 2003**, 37-44.
- Matson, R.S., Rampal, J.B. and Coassin, P.J. (1994) Biopolymer synthesis on polypropylene supports. I. Oligonucleotides. *Anal Biochem*, **217**, 306-310.
- Mayhall, C.G. (2001) Ventilator-associated pneumonia or not? Contemporary diagnosis. *Emerg Infect Dis*, **7**, 200-204.
- Medlin, J. (2001) Array of hope for gene technology. *Environ Health Perspect*, **109**, A34-37.
- Nabel, E.G. (2003) Cardiovascular disease. *N Engl J Med*, **349**, 60-72.
- Orum, H., Jakobsen, M.H., Koch, T., Vuust, J. and Borre, M.B. (1999) Detection of the factor V Leiden mutation by direct allele-specific hybridization of PCR amplicons to photoimmobilized locked nucleic acids. *Clin Chem*, **45**, 1898-1905.
- Rubin, E. and Farber, J.-L. (1994) *Pathology*. J.B. Lippincott Company, Philadelphia.
- Sanders, W.E., Jr. and Sanders, C.C. (1997) Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clin Microbiol Rev*, **10**, 220-241.
- Schaechter, M., Medoff, G. and Eisenstein, B. (1999) *Microbiologie et pathologie infectieuse*. De Boek Université, Bruxelles.
- Schena, M., Shalon, D., Davis, R.W. and Brown, P.O. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*, **270**, 467-470.

- Schena, M., Shalon, D., Heller, R., Chai, A., Brown, P.O. and Davis, R.W. (1996) Parallel human genome analysis: microarray-based expression monitoring of 1000 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 10614-10619.
- Southern, E., Mir, K. and Shchepinov, M. (1999) Molecular interactions on microarrays. *Nat Genet*, **21**, 5-9.
- Suetens, C. and Leens, E. (2002) Surveillance des infections nosocomiales aux Soins Intensifs: Résultats nationaux 1997 - 2001. Institut Scientifique de la Santé Publique, Bruxelles, p. 26.
- Tablan, O., Anderson, L., Arden, N., Breiman, R., Butler, J., McNeil, M. and Pearson, M. (1997) Guidelines for prevention of nosocomial pneumonia. Centers for Disease Control and Prevention. *MMWR Recomm Rep*, **46**, 1-79.
- Watson, J.D. and Crick, F.H. (1953) Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature*, **171**, 964-967.
- Wen, W.H., Bernstein, L., Lescallett, J., Beazer-Barclay, Y., Sullivan-Halley, J., White, M. and Press, M.F. (2000) Comparison of TP53 mutations identified by oligonucleotide microarray and conventional DNA sequence analysis. *Cancer Res*, **60**, 2716-2722.
- Whatmore, A.M., Efstratiou, A., Pickerill, A.P., Broughton, K., Woodard, G., Sturgeon, D., George, R. and Dowson, C.G. (2000) Genetic relationships between clinical isolates of *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus oralis*, and *Streptococcus mitis*: characterization of "Atypical" pneumococci and organisms allied to *S. mitis* harboring *S. pneumoniae* virulence factor-encoding genes. *Infect Immun*, **68**, 1374-1382.
- Zammatteo, N., Hamels, S., De Longueville, F., Alexandre, I., Gala, J.L., Brasseur, F. and Remacle, J. (2002a) New chips for molecular biology and diagnostics. *Biotechnol Annu Rev*, **8**, 85-101.
- Zammatteo, N., Jeanmart, L., Hamels, S., Courtois, S., Louette, P., Hevesi, L. and Remacle, J. (2000) Comparison between different strategies of covalent attachment of DNA to glass surfaces to build DNA microarrays. *Anal Biochem*, **280**, 143-150.
- Zammatteo, N., Lockman, L., Brasseur, F., De Plaen, E., Lurquin, C., Lobert, P.E., Hamels, S., Boon, T. and Remacle, J. (2002b) DNA microarray to monitor the expression of MAGE-A genes. *Clin Chem*, **48**, 25-34.